



Universidade de Aveiro

Departamento de Química

Ano 2016/2017

**Iris Regina
Santos Oliveira**

**Extração e análise de matéria gorda em
alimentos - validação de método**

Relatório de estágio apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo Alimentar, realizada sob orientação científica da Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Bruno Manuel Galinho Henriques, Investigador Pós-Doc do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

“Se queres ser bem-sucedido, precisas de dedicação total, procurar o teu último limite e dar o melhor de ti mesmo”

Ayrton Senna

o júri

presidente

Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

orientador(a)

Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

Mestre Lina Dulce Magalhães Carvalho Santos

Responsável pelo Laboratório de ICP do Laboratório Central de

Análises da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Eduarda Pereira, por todo o saber transmitido, todo o acompanhamento, toda ajuda e disponibilidade para que este ano corresse da melhor forma. Agradeço a calma, o carinho e sobretudo todo o apoio que me deu.

Agradeço à Mónica Ferreira, técnica da Mérieux NutriSciences, por todo o tempo de ensino que disponibilizou, pela sabedoria transmitida, pelo companheirismo e por nunca me ter deixado desistir, permitindo que saísse com uma experiência profissional enriquecedora. Mais que uma relação orientadora-estagiária, trago uma amizade para a vida.

Agradeço à Alice Santos, responsável pelo laboratório de química da Mérieux NutriSciences, pela oportunidade que me concedeu e por ter acreditado nas minhas capacidades.

A todos os colaboradores da Mérieux NutriSciences, que de uma forma ou de outra, marcaram a minha passagem pela empresa da melhor forma, um bem-haja!

À minha mãe, obrigada. Pelo encorajamento e compreensão nos momentos mais difíceis mas sobretudo, pelo apoio incondicional ao longo destes anos, etapa após etapa.

A todos que me apoiaram, que não estando aqui mencionados, não são esquecidos. Obrigada!

palavras-chave

Matéria gorda, qualidade alimentar, validação de métodos

resumo

A matéria gorda está presente nos mais variados alimentos, essencialmente nos alimentos compostos por gorduras, como é o caso de carnes e produtos cárneos, bolachas, biscoitos e manteigas. A matéria gorda é o macronutriente que fornece mais energia por grama, sendo um dos macronutrientes mais importantes a controlar na dieta.

A quantificação da matéria gorda num alimento, pode ser feita nos laboratórios especializados da empresa Mérieux NutriSciences, que se dedica ao controlo analítico de alimentos. Para efetuar essa quantificação, a empresa necessita de ter o método validado.

Assim, o objetivo principal deste trabalho é efetuar a validação de um método de análise de matéria gorda usando um equipamento recentemente adquirido pela empresa, o *Hydrotec* 8000, que faz hidrólise ácida automaticamente, para substituição do método clássico de análise de matéria gorda.

Os parâmetros validados no âmbito deste Estágio foram o limite de quantificação do método, a sua repetibilidade e precisão intermédia, tendo-se obtido valores de acordo com os critérios estabelecidos pela empresa.

O novo método foi aplicado na análise da matéria gorda nas seguintes matrizes: pratos cozinhados, doces, matérias primas, substitutos de refeição, café, carnes, cereais, frutos, sementes oleaginosas, lacticínios e pescados.

keywords

Method validation, food quality, fat matter

abstract

Fat is present in a wide variety of food, mainly in foods such as meats and meat products, biscuits, cookies and butters. Fats are the macronutrient that provides more energy per gram and is one of the most important macronutrients to be controlled in the diet.

The quantification of fat can be done at the specialized laboratories of Mérieux NutriSciences, which is dedicated to the analytical control of foods. However, to carry out this quantification, the company needs to have the method validated.

The main objective of this work is to validate the method of analysis of fats using a recently acquired equipment by the company, *Hydrotec 8000*, which performs acid hydrolysis automatically, for substitution of the previous classic method for fat matter analysis.

The parameters that were evaluated in this work were quantification limit, repeatability and intermediate precision and values within the internal quality criteria of Mérieux NutriSciences were obtained.

The new method was applied on the quantification of fat in the following food items: cooked dishes, confectionery, raw material, meal substitutes, meat products, cereals, fruits, oil seeds, dairy products and fish.

Índice

1. Introdução e objetivos	1
1.1 Proposta para o trabalho de Estágio	2
1.2 Silliker Portugal S.A., uma empresa Mérieux NutriSciences	3
1.3 Matéria Gorda	5
1.3.1 Análise de matéria gorda pelo método de hidrólise usando química clássica	6
1.3.2 Análise de matéria gorda pelo método em equipamento.....	8
1.3.3 Extração da matéria gorda por Soxtec	10
1.3.4 O método de Soxhlet.....	12
1.4 Validação de métodos	14
1.4.1 Validação indireta	15
1.4.2 Validação direta.....	20
1.5 Objetivo do trabalho.....	20
2. Trabalho laboratorial	25
2.1 Lavagem do material e equipamentos	26
2.1.1 Lavagem do material utilizado na análise de matéria gorda	26
2.1.2 Lavagem do equipamento de extração.....	27
2.1.3 Manutenção do equipamento de hidrólise automática – Hydrotec.....	27
2.2 Preparação das amostras	27
2.3 Análise de matéria gorda pelo método de hidrólise usando química clássica	28
2.4 Análise de matéria gorda pelo método em equipamento	29
2.5 Extração da matéria gorda pelos dois métodos	33
2.6 Controlo de qualidade	33
3. Resultado da validação do método para quantificação de matéria gorda	35
3.1 Validação do método em equipamento para quantificação de matéria gorda.....	36
3.1.1 Limite de quantificação	37
3.1.2 Precisão	37
3.1.3 Veracidade.....	50

3.2 Resumo dos parâmetros avaliados na validação do método	51
4. Considerações finais	53
Referencias bibliográficas.....	55
Anexo I – Análise por método clássico de matéria gorda	59
Anexo II - Análise de matéria gorda por método em equipamento	61
Anexo III – Estudo da repetibilidade	62
Anexo IV – Estudo da repetibilidade relativa	65
Anexo V – Valores críticos para o Teste de Grubbs.....	69
Anexo VI – Valores obtidos para o Teste de Grubbs	70
Anexo VII – Estudo da precisão intermédia	72
Anexo VIII – Estudo da precisão intermédia relativa	85

Índice de figuras

Figura 1 - Esquema de hidrólise do método de química clássica para análise de matéria gorda (autoria própria, 2017)	6
Figura 2 - Organigrama de análise de matéria gorda pelo método clássico	7
Figura 3 - Fotografia do equipamento Hydrotec 8000 usado para hidrólise ácida (FOSS, 2014)	9
Figura 4 - Esquema do sistema integrado para hidrólise e extração (FOSS, 2014)	9
Figura 5 - Fotografia do equipamento Soxtec 8000 usado para extração de matéria gorda (FOSS, 2014)	10
Figura 6 - Esquema do princípio de extração de matéria gorda (Blum-Fretz, et al., 2007) ..	11
Figura 7 - Cápsula de celulose e copo de extração em alumínio (autoria própria, 2017) ..	29
Figura 8 - Hidrocápsula e exemplificação de suporte para hidrocápsulas (FOSS, 2017)	31

Índice de tabelas

Tabela 1 - Normas e procedimentos aplicáveis na análise de matéria gorda.....	7
Tabela 2 - Indicação do peso da amostra a usar em função da matriz e respectiva norma ou procedimento correspondente	28
Tabela 3 - Identificação do peso da amostra a usar em função da matriz de acordo com as indicações da marca que comercializa o equipamento	30
Tabela 4 - Condições de hidrólise do equipamento Hydrotec 8000 para carnes, derivados e produtos cárneos e para outras matrizes.....	31
Tabela 5 - Condições de hidrólise do equipamento Hydrotec 8000 para cacau e produtos derivados	31
Tabela 6 - Programa de temperatura do ciclo de extração do Soxtec 8000	33
Tabela 7 - Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade para a quantificação de matéria gorda pelo método de análise em equipamento	40
Tabela 8 - Valores obtidos para o estudo da repetibilidade na amostra de chocolate em pó	42
Tabela 9 - Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade para a quantificação de matéria gorda pelo método de análise em equipamento e forma de efetuar a sua minoração.....	43
Tabela 10 - Resultados obtidos para o teste de Grubbs para a quantificação de matéria gorda pelo método de análise em equipamento	45
Tabela 11 - Resultados obtidos para o estudo da PI para a quantificação de MG pelo método de análise em equipamento no grupo açúcar e produtos açucarados	48

Tabela 12 - Resultados gerais obtidos para o estudo da precisão intermédia para a quantificação de matéria gorda pelo método de análise em equipamento e forma de efetuar a sua minoração.....	49
Tabela 13 - Resultados obtidos para o estudo da PI para a quantificação de MG pelo método de análise em equipamento	49
Tabela 14 - Resultados obtidos nas matrizes certificadas analisadas pelo método em equipamento	50
Tabela 15 - Parâmetros de desempenho para a quantificação de matéria gorda através de método em equipamento	52

1. Introdução e objetivos

1.1 Proposta para o trabalho de Estágio

A Silliker Portugal S.A. é uma empresa independente de prestação de serviços para o setor agro-alimentar fundada em 1993, é formada por especialistas de várias áreas do setor alimentar, que se dedica a disponibilizar conhecimento, experiência e dedicação na colaboração com os seus clientes em vários projetos e estudos. A qualidade do serviço prestado é baseada sobretudo na competência da sua equipa, na adequação dos métodos, na atualização constante de procedimentos e equipamentos. O laboratório garante que todos os ensaios realizados são sempre executados de acordo com os métodos estabelecidos, seguindo os requisitos do cliente e segundo o referencial normativo NP EN ISO/IEC 17025.

Para colmatar uma necessidade a nível da análise de matéria gorda, foi proposto este estágio que consiste na validação de um método de análise química. Partindo do método de química clássica existente na empresa, pretende-se validar o método de análise de matéria gorda em diversas matrizes, com naturezas diferentes e variadas, como por exemplo a mostarda, farinha láctea, refeição para bebé e alimento para gato utilizando um método em equipamento.

Ambos os métodos têm um tronco comum: pesagem da amostra, seguida de hidrólise ácida a quente, lavagem com água quente, secagem e posterior extração com solvente, diferenciando-se no passo da hidrólise. No método clássico a hidrólise é feita em mantas de aquecimento com posterior lavagem manual, no método em equipamento é utilizado o equipamento de hidrólise automática, o *Hydrotec 8000*, em que a hidrólise e lavagem são feitas automaticamente. Para que o método em equipamento possa vir a ser adotado como método alternativo é necessário que o estudo completo das matrizes propostas seja válido, bem como deverá haver coerência com o método manual nos resultados obtidos.

1.2 Silliker Portugal S.A., uma empresa Mérieux NutriSciences

O *Institut Mérieux*, um instituto francês com experiência em biologia industrial e ao serviço da medicina e da saúde pública por todo o mundo, é o pilar de toda a conceção da *Mérieux NutriSciences*. Tem como objetivo principal combater doenças infecciosas e cancro, desenvolvendo soluções a nível de diagnóstico, da imunoterapia, segurança alimentar e nutrição. Foram criadas três empresas como a *bioMérieux* (com experiência em soluções de diagnóstico *in vitro* para aplicações clínicas e industriais), a *Transgene* (dedicada a vacinas terapêuticas e produtos de imunoterapia para tratamento de cancro e doenças infecciosas) e a *Mérieux NutriSciences*, focada na inovação, amplificando a oferta de soluções para os desafios da saúde pública em todo o mundo. Os desafios principais das atuais políticas de saúde em muitos países são precisamente a segurança alimentar e a componente nutricional.

Para enfrentar esses desafios foi então desenvolvida a *Mérieux NutriSciences*, com sede em França e nos Estados Unidos, que já apresenta 50 anos de experiência no setor de segurança e qualidade alimentar, conquistando a confiança da indústria alimentar e que já expandiu a sua experiência para outros setores industriais como: água e ambiente, farmacêutica e dispositivos médicos, higiene pessoal e cosmética, agroquímicos e bens de consumo. Encontra-se presente em 21 países, contando com cerca de 100 laboratórios de análises acreditados, sendo os principais clientes profissionais da cadeia agroalimentar, farmacêuticos e companhias de cosméticos e fabricantes de bens de consumo (NutriSciences, 2016). A *Mérieux NutriSciences* pode apoiar as necessidades das empresas como monitorização, certificação e rastreabilidade, garantindo a qualidade das suas matérias-primas e do seu ambiente, bem como dos seus processos de fabrico e dos próprios produtos; assistindo e acompanhando o cliente no desenvolvimento de novos produtos alimentares.

A visão da companhia passa pela preocupação acerca da saúde e do bem-estar dos consumidores, havendo um esforço para oferecer os melhores serviços aos clientes.

“Because you care about consumer’s health”

A política de qualidade do serviço na Silliker Portugal S.A é baseada na competência da equipa, na adequação dos métodos, na atualização constante de procedimentos e equipamentos, apostando no sistema de melhoria contínua (NutriSciences, 2016).

A missão da empresa é garantir que todo o trabalho realizado na Silliker tem como objetivo final a satisfação das exigências do cliente, procurando que todos os intervenientes realizem esse trabalho com máximo rigor para atingir o nível de qualidade desejado. Esse nível de qualidade é atingido através de uma política da qualidade que consiste em parâmetros importantes tais como: estabelecer políticas e procedimentos de trabalho que visem assegurar a qualidade do serviço prestado; garantir que todos os ensaios realizados sejam sempre executados de acordo com os métodos estabelecidos, seguindo os requisitos do cliente e segundo o referencial normativo NP EN ISO/IEC 17025; e inculcar em todos os elementos da empresa o espírito de qualidade, transmitindo a importância que cada um assume nas tarefas que desempenham e a sua importância no resultado final.

A estrutura da Silliker permite oferecer aos seus clientes uma ampla gama de serviços como controlo analítico de alimentos, controlo analítico de águas, monitorização ambiental, serviços de investigação (como a estabilidade do produto, qualidade e segurança, desde o seu desenvolvimento até à sua comercialização), consultadoria em segurança e qualidade alimentar, análise sensorial e estudos de apoio ao consumidor, consultadoria em rotulagem de géneros alimentícios, gestão de informação (como revisões técnicas com os próprios dados do cliente do controlo da qualidade ou histórico de fornecedores), programas de formação e auditorias e inspeções (NutriSciences, 2016).

A Silliker cumpre com os critérios de acreditação para os laboratórios de ensaios estabelecidos na NP EN ISO/IEC 17025, reconhecido pelo Instituto Português de Acreditação, IPAC, através do certificado de acreditação nº L0087. Assim, a metodologia utilizada no serviço analítico, corresponde a métodos oficiais, publicados em normas portuguesas, por entidades comumente aceites (ISO – *International Organization for Standardization*, IDF – *International Dairy Federation*, AOAC – *Association of Official*

Analytical Chemists) ou desenvolvidos internamente e devidamente validados; sendo que, todas as determinações analíticas efetuadas para obtenção da informação nutricional obrigatória são realizados recorrendo a ensaios acreditados.

Uma das necessidades da empresa é a quantificação da matéria gorda, que deve ser feita através de métodos validados, para que a análise apresente a qualidade exigida pelo cliente.

1.3 Matéria Gorda

Existem inúmeros alimentos essencialmente compostos por gorduras, como é o caso de manteigas, margarinas, doces, carnes, produtos cárneos e derivados, bolachas, biscoitos e chocolates. No entanto, todos os alimentos apresentam quantidades de gordura diferentes, alimentos mais secos (farinhas de carne, por exemplo) tendem a ter menor teor de gordura que alimentos processados (como sobremesas).

Por recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS), o consumo de gorduras deve situar-se entre os 15-30%. No entanto, esse intervalo não é respeitado pelo consumidor, dado que cerca de 30% da sua dieta diária é rica em gorduras. No entanto, a OMS alerta para que seja ingerido na dieta diária menos de 10% de gorduras saturadas. Logo, é possível verificar que existe uma demanda na importância dos lípidos nos alimentos, assim como a necessidade da sua determinação nos alimentos, para que seja possível manter o controlo de qualidade dos alimentos ingeridos (OMS, 2016).

Como componente de alimentos, os lípidos têm um impacto importante nas suas propriedades sensoriais, podendo afetar a cor, sabor e textura, melhorando as suas características organolépticas, mas, são suscetíveis a processos de oxidação ou a transformações químicas ou enzimáticas, sendo as reações de oxidação uma das maiores fontes de deterioração que ocorre durante o fabrico, processamento, armazenamento, distribuição e preparação dos alimentos (Sikorski, 2002). Embora os níveis de lípidos nos alimentos seja relativamente baixo, a oxidação lípidica pode afetar a qualidade de alimento e inclusive o reduzir o seu tempo de prateleira (Ahmed, 2016).

Os lípidos, que são chamados usualmente de matéria gorda ou gordura, são biomoléculas orgânicas compostas por moléculas de oxigénio, hidrogénio e carbono, salvo raras exceções que podem conter fósforo. Estas biomoléculas têm a particularidade de serem insolúveis em água, devido à cadeia hidrocarbonada, mas são solúveis em solventes orgânicos, além de que sofrem decomposição através de calor.

Existem diferentes classes de lípidos na alimentação: os fosfolípidos que são constituintes das membranas celulares, o colesterol que é necessário para construir e manter as paredes celulares, os triglicéridos que são produzidos e armazenados como reserva alimentar e os ácidos gordos livres. Os triacilgliceróis, glicerofosfolípidos e esfingolípidos são exemplos de lípidos hidrolisáveis e todos eles incluem na sua composição ácidos gordos. Esteróis e vitaminas lipossolúveis fazem parte da classe de lípidos não hidrolisáveis (Blei, 1999). Em suma, os lípidos são o macronutriente que fornece mais energia por grama, sendo por isso o que tem maior densidade energética.

1.3.1 Análise de matéria gorda pelo método de hidrólise usando química clássica

A análise de matéria gorda (MG) no laboratório da Silliker Portugal S.A. é feita através do método de química clássica, com recurso a hidrólise ácida (Figura 1) para libertação das frações lipídicas das amostras e posterior extração da MG utilizando o método de *Soxhlet* adaptado.

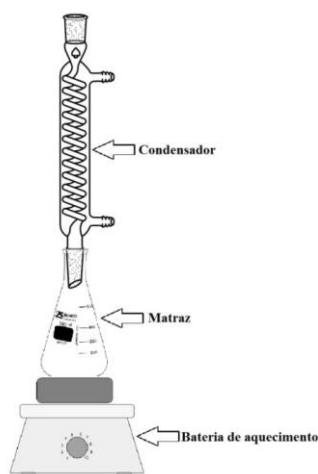


Figura 1 - Esquema de hidrólise do método de química clássica para análise de matéria gorda (autoria própria, 2017)

Para efetuar a análise da MG nas amostras alimentares, segue-se diferentes normas e procedimentos internos da empresa, conforme o tipo de matriz a analisar, descritos na tabela seguinte:

Tabela 1 - Normas e procedimentos aplicáveis na análise de matéria gorda

Matriz	Norma
Carnes, derivados e produtos cárneos	NP 1613:1979
Pescados e produtos aquacultura	NP 1974:2009
Cacau e produtos derivados	NP 1719:1981
Alimento para animais	NP 0876B
Agroalimentar	PAFQ.069.1

Existe um tronco comum a todas as normas e procedimentos internos: pesagem da amostra, seguida de hidrólise ácida a quente, lavagem com água quente, secagem e posterior extração com solvente; variando apenas a quantidade da toma e a concentração do ácido, conforme a matriz em questão.

Na empresa, as normas e os correspondentes procedimentos internos encontram-se validados para a análise de matéria gorda pelo método clássico. As normas utilizadas na Silliker para análise de MG, estão divididas por grupos de matrizes (tabela 1) mas, todas as normas seguem um tronco comum, sendo o processo resumidamente descrito da seguinte forma:

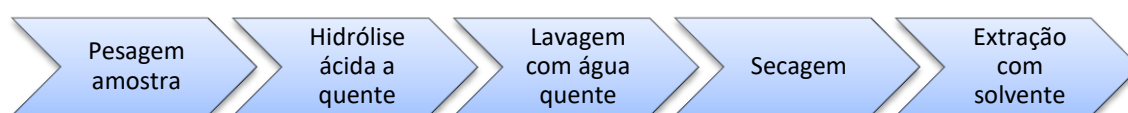


Figura 2- Organograma de análise de matéria gorda pelo método clássico

Neste procedimento, o processo inicia-se com a hidrólise ácida da amostra aquecida, dá-se posteriormente um arrefecimento da solução, filtração e lavagem com água quente e secagem do resíduo à temperatura ambiente. Seguidamente, a MG é extraída com éter

de petróleo no extrator, havendo evaporação do solvente, secagem da MG extraída e por fim, pesagem do extrato.

O método clássico, manual, é moroso, tem elevado gasto de solventes e tem perda de amostra devido às múltiplas transferências da amostra entre os passos do método, inadequada neutralização do ácido, arrefecimento e lavagem demorados. Devido a estas desvantagens e para facilitar a análise de matéria gorda, foi adquirido pela Silliker Portugal S.A. um equipamento capaz de perfazer hidrólise ácida, arrefecimento e lavagem automaticamente: o *Hydrotec 8000*.

1.3.2 Análise de matéria gorda pelo método em equipamento

Como referido anteriormente, o objetivo principal deste trabalho é validar um método que usa o equipamento adquirido para a análise de MG. Sendo este equipamento uma mais-valia para a análise de MG, quer na poupança de tempo e reagentes, bem como na variedade de amostras que se podem analisar ao mesmo tempo num só ciclo.

Uma vez que a análise de matéria gorda feita pelo método clássico apresenta falhas que levam posteriormente a reclamações e confirmações por parte dos clientes que requerem este tipo de análise aos seus produtos, a Silliker Portugal S.A. decidiu melhorar o processo de análise e sobretudo adequa-lo às exigências dos seus clientes.

Assim, em Setembro de 2016 foi adquirido um equipamento que faz hidrólise ácida, lavagem com água quente e secagem da amostra, no correr de um ciclo programável. Este equipamento, o *Hydrotec 8000* (figura 3), foi desenvolvido pela Foss e faz parte da *Tecator Line*, uma linha que dá resposta à análise de matéria gorda total para laboratórios que analisam alimentos (FOSS, 2017).



Figura 3 - Fotografia do equipamento Hydrotec 8000 usado para hidrólise ácida (FOSS, 2014)

O princípio de funcionamento deste equipamento baseia-se no método clássico de análise de MG. A amostra é tratada sobre calor com ácido clorídrico, fazendo com que as frações lipídicas da amostra sejam acessíveis à extração com solvente, através de processos químicos ou mecânicos. A amostra é arrefecida e filtrada, e o resíduo após hidrólise é lavado com água quente para neutralizar o ácido e o ciclo finaliza com a secagem das amostras para posterior extração da MG utilizando o método de *Soxlet* adaptado (FOSS, 2017).

Este equipamento tem um sistema integrado para hidrólise e extração que visa reduzir o manuseamento manual e evitar potenciais erros humanos, permitindo fazer operações de transferência simples e mais rápidas. Isso deve-se ao seu sistema de cápsula, que se denomina por hidrocápsula, que permite manter as amostras dentro da mesma cápsula durante todo o processo desde a pesagem, hidrólise e extração (figura 4) (FOSS, 2014)

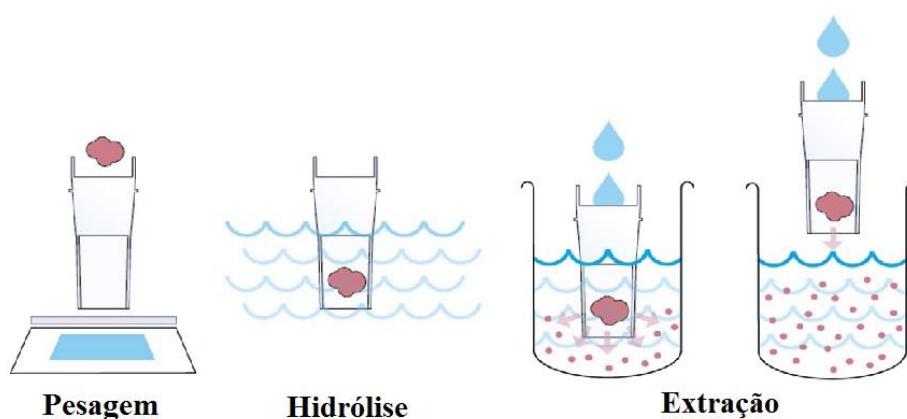


Figura 4 - Esquema do sistema integrado para hidrólise e extração (FOSS, 2014)

1.3.3 Extração da matéria gorda por Soxtec

Para ambos os métodos (clássico e com equipamento) referidos anteriormente, no final da secagem, é necessário proceder à extração da matéria gorda, que é efetuada através de um equipamento *Soxtec* 8000 (figura 5), desenvolvido pela Foss e que também faz parte da *Tecator Line*.



Figura 5 - Fotografia do equipamento Soxtec 8000 usado para extração de matéria gorda (FOSS, 2014)

O princípio desta unidade baseia-se numa câmara de extração inventada por *Franz Soxhlet* em 1879, que segue o princípio original do método: a amostra é colocada numa câmara de extração e o solvente é aquecido em refluxo. A câmara de extração é então esvaziada quando o nível marcado é atingido, com o solvente a sair para o recipiente aquecido. Em cada ciclo, uma porção do composto não volátil (matéria gorda) é dissolvida no solvente. No fim de cada ciclo, o composto desejado está concentrado dentro do recipiente (figura 6) (Blum-Fretz, et al., 2007).

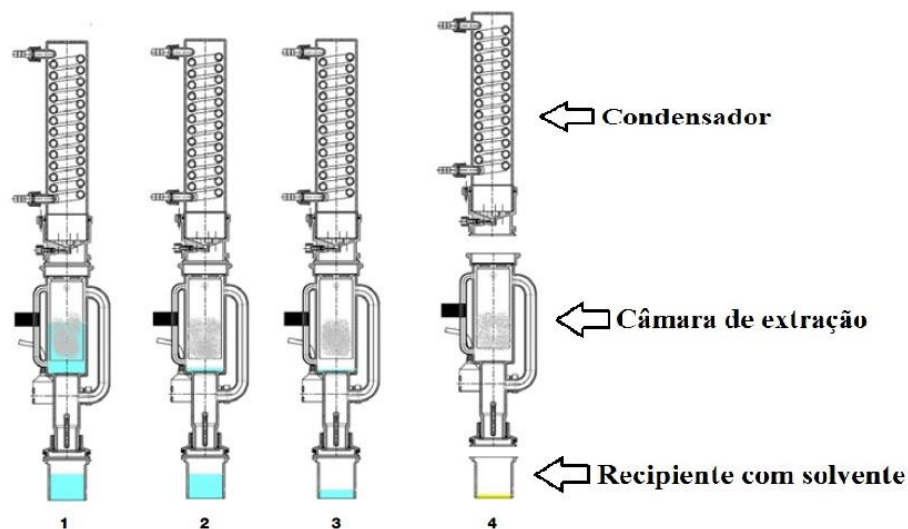


Figura 6 - Esquema do princípio de extração de matéria gorda (Blum-Fretz, et al., 2007)

- 1) Extração: a câmara de extração é enchida com o solvente condensado. Assim que o solvente chegue ao sensor ótico, a câmara é esvaziada com a abertura da válvula;
- 2) Lavagem: a válvula encontra-se sempre aberta, permitindo ao solvente do condensador lavar a amostra;
- 3) Secagem: o solvente é evaporado e é recolhido no tanque dentro do equipamento, permitindo ser reutilizado para outras extrações;
- 4) Após extração: o recipiente contendo o extrato pode ser removido do equipamento.

O método de *Soxhlet* em cima descrito é reconhecido pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) como o método *standard* para análise de matéria gorda de alimentos em laboratórios acreditados (MIS, 1998).

A unidade de extração *Soxtec* 8000 é um sistema automático para extração rápida de matéria gorda solúvel numa ampla gama de matrizes. Durante o processo de extração, o princípio de funcionamento do equipamento perfaz 4 passos: ebulição, lavagem, recuperação de solvente e secagem. É considerado uma unidade multi-extrator para a

extração de lípidos de diferentes amostras ou para replicados da mesma amostra. (Shahidi, 2001)

Este equipamento faz parte do sistema integrado mencionado anteriormente no ponto 1.3.2, dado que as hidrocápsulas que são utilizadas no *Hydrotec*, após hidrólise e secagem, são adaptáveis diretamente ao extrator, permitindo aumentar a segurança nas operações que envolvem a transferência da amostra, para que não haja perdas conforme ocorre no método clássico de análise de matéria gorda. (Luthria, 2004)

1.3.4 O método de Soxhlet

Existem diversos métodos analíticos aplicados à análise química de alimentos, que exigem uma extração líquido-líquido como procedimento para separar uma matéria solúvel, quantificando-a num determinado componente. É o caso de procedimentos de extração líquido-líquido que envolvem a utilização de solventes para extração através de diferentes técnicas como extração em semi-contínuo ou contínuo. (Pomeranz, 1994)

O método de *Soxhlet* é o método mais vulgarmente utilizado na indústria alimentar para análise de MG. Vários fabricantes têm apresentado versões modificadas do método de *Soxhlet* para quantificar o teor de lípidos mais rapidamente, como é o caso do equipamento *Soxtec*. (Analysis of Lipids, 2003)

No entanto, apesar de o método de *Soxhlet* convencional ser eficiente, tem desvantagens, tais como o tempo de extração ou a fraca reprodutibilidade. Para eliminar essas desvantagens, foram desenvolvidos vários métodos de extração de gorduras, como por exemplo o método de extração com hidrólise prévia. (T. Pérez-Palacios, 2008)

Originalmente, o método de *Soxhlet* era aplicado na determinação da gordura do leite, sendo uma técnica manual com recurso à extração líquido-líquido convencional; era um processo moroso devido ao elevado número de vezes que tinha de ser repetida a extração até esta estar completa. A extração convencional também tinha vantagens, tais como a amostra ser colocada em contato, várias vezes, com porções novas de solvente,

facilitando a extração. Uma outra vantagem é que após a extração não é necessário filtrar a amostra, diminuindo o tempo de processamento das amostras, devido a ser possível fazer várias extrações em simultâneo e em paralelo. Esta técnica é simples, não sendo necessária muita experiência na sua aplicação e sendo possível extrair elevadas quantidades de amostra.

No entanto, quando comparada com outras técnicas de análise de amostras sólidas, as maiores desvantagens do *Soxhlet* são o elevado tempo de extração e o uso de grandes quantidades de solvente. Assim, o método convencional de *Soxhlet* foi o ponto de partida para o desenvolvimento de várias modificações. Essas modificações foram introduzidas nas últimas décadas e levaram a que o *Soxhlet* se equiparasse às mais recentes tecnologias para análise de amostras sólidas, encurtando tempos de extração e automatizando o sistema de extração. (Luque De Castro, 2010)

Na Silliker, o método de *Soxhlet* está validado para ser utilizado em diversas matrizes como carnes e derivados, chocolates, pescados, alimentos para animais e produtos agro-alimentares. Mas, este método foi desenvolvido para ser usado na análise de carnes e produtos derivados, e por isso, tem sido alvo de vários estudos para avaliar a sua eficácia na extração de MG de diferentes amostras alimentares.

Pérez-Palacios et al. em 2008 avaliou a eficiência de 6 métodos de extração para quantificação do teor de lípidos em carnes e derivados. Dos métodos estudados destacam-se o método de *Soxhlet* convencional e o método de *Soxhlet* contínuo, ambos com e sem hidrólise prévia (AOAC, 1990). O teor de lípidos foi determinado em 9 produtos cárneos diferentes, com vários teores de MG (peito de peru, lombo porco, fiambre, presunto, mortadela, hambúrguer, linguiça e salame). Para todos os métodos testados, a extração mais eficaz foi sempre a que teve uma hidrólise prévia. Este resultado deve-se à desnaturação de proteínas e amidos presentes nas amostras alimentícias, através de hidrólise ácida, que faz com que os lípidos se encontrem mais acessíveis à ação do solvente, tornando extração por *Soxhlet* mais eficiente.

1.4 Validação de métodos

É necessário evidenciar a qualidade de um método de ensaio analítico, dado que este pode apresentar possíveis erros, sistemáticos ou aleatórios, que podem levar a uma alteração do valor do resultado final.

Para controlar a qualidade dos resultados e garantir a interpretação e confiabilidade dos mesmos, o método analítico é sujeito a etapas de avaliação para garantir a sua correta validação. Segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025 – Requisitos gerais de competências para laboratórios de ensaio e calibração, a validação de um método consiste sobretudo na “confirmação, através de exame e apresentação e evidência objectiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização pretendida estão satisfeitos”. (IPQ, 2007)

É importante que o método de validação esteja descrito sob forma de um procedimento analítico físico-químico (PAFQ) e que a determinação dos parâmetros associados à validação seja efetuada em equipamentos/instrumentos devidamente calibrados (respeitando as calibrações periódicas necessárias) além do treino e qualificação adequados dos analistas. (Inmetro, 2007; IPQ, 2007)

Uma validação é processo dinâmico que está presente no início do desenvolvimento do método e posteriormente, segundo um plano de revalidação periódica, de acordo com características do método. Sempre que um método sofra alterações, é necessário proceder a uma nova validação. (Relacre, 2000; Relacre, 1996)

Assim, o laboratório tem liberdade para analisar os parâmetros que pretender para incluir no plano de validação, consoante o tipo de metodologia em questão (Eurachem, 2014), dado que avaliar todos os parâmetros nem sempre é necessário, porque a validação de um método analítico não necessita de passar por todas as etapas, podendo-se efetuar apenas uma validação parcial do método.

Para que um método seja completamente validado, na Conferência Internacional sobre Harmonização e a IUPAC, recomendam que sejam avaliados os seguintes parâmetros:

identificação, especificidade e seletividade, sensibilidade, limiares analíticos, linearidade e gama analítica, precisão, veracidade, robustez e coerência. (ICH, 2005)

Para efetuar a validação de um método de ensaio, deverá seguir-se as orientações do guia OGC001 do IPAC (2010), que indica que ensaios são necessários e convenientes para a validação do método.

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros através de dois tipos de avaliação: direta e indireta.

Avaliação indireta, evidencia as seguintes características: estudo da representatividade do método; estudo dos princípios (fundamentos) teóricos do método para evidenciar a base científica; estudo de interferências e fontes de erro para delinear a aplicabilidade; estudos de otimização das condições operatórias e/ou robustez do método para permitir uma otimização e harmonização da sua execução; estudo dos parâmetros característicos do método.

Avaliação direta, comparando com referências aceites pode ser feita por: comparação com métodos normalizados ou de referência; comparação com padrões ou materiais de referência certificados; comparações interlaboratoriais.

1.4.1 Validação indireta

A análise indireta visa determinar e evidenciar os parâmetros característicos do método, como a identificação; especificidade e seletividade; sensibilidade; limiares analíticos; linearidade e gama de trabalho; precisão; robustez e coerência.

A identificação visa demonstrar a capacidade do método para identificar inequivocamente a presença ou ausência do analito na amostra, comprovando que a propriedade físico-química em que o método analítico se baseia está relacionada com a presença do analito; por sua vez, o estudo da especificidade e da seletividade é realizado para identificar interferências no método e que influência estas têm nos resultados, dado que a amostra pode conter outros componentes que possam interferir com a medição; a sensibilidade por sua vez avalia a capacidade de um método ou equipamento distinguir pequenas diferenças de concentração num analito; a linearidade é a capacidade de um

método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, enquanto a gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentrações para qual o analito pode ser determinado com boa linearidade, precisão e veracidade; por ultimo, avaliação da robustez de um método indica a fidelidade do método perante o seu uso numa rotina, servindo para estabelecer as condições importantes a controlar e diz-se que um método é coerente quando é avaliada a sua capacidade de levar sempre ao mesmo resultado. Estes parâmetros não farão parte da validação do método de quantificação de matéria gorda efetuado neste Estágio, devido a não serem adequados ao tipo de método em questão: método gravimétrico.

Assim, neste Estágio, os parâmetros de validação indireta estudados na validação foram os seguintes:

Limites analíticos - Os limites analíticos estão associados a dois conceitos, limite de detecção (LD) (não aplicável à validação em questão) e limite de quantificação (LQ) da técnica experimental e limites de detecção e quantificação do método analítico, que devem ser interpretados conforme recomendado pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Limite de quantificação: corresponde ao início da gama em que o coeficiente de variação (incerteza relativa) do sinal se reduziu a valores razoáveis para se poder efetuar uma detecção quantitativa, com determinada veracidade e precisão.

$$L.Q. = Sb + 10s_b$$

Equação 1

Onde:

Sb - ordenada na origem da curva de calibração

s_b - desvio padrão residual da curva de calibração

O limite de quantificação é testado recorrendo-se a uma série de padrões internos, em condições de precisão intermédia, em que a sua concentração deverá ser igual ou próxima à do limiar de quantificação.

Este limite depende de vários fatores que variam com o tempo, como contaminações, tipo de amostra ou equipamento, devendo ser reavaliados sempre que haja uma variação de critérios, pessoal ou equipamento, quando se opera com gamas baixas de concentração. (Relacre, 2000)

Sempre que ocorram alterações na rotina do método, é necessário proceder a atualizações nos limites experimentais, mesmo que haja um limite de quantificação teórico definido para o método.

Precisão - A precisão avalia o grau de concordância entre valores medidos, obtidos por medições repetidas, na mesma amostra ou amostras semelhantes, sob condições específicas, sendo este parâmetro expressado pelo coeficiente de variação (CV) e apresentado sob forma de percentagem através do cálculo da equação:

$$CVr (\%) = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 2

Onde:

S_{ri} - desvio padrão das medições

\bar{x} - média aritmética das medições

A precisão é avaliada através da reprodutibilidade, repetibilidade e precisão intermédia. Para o ensaio de repetibilidade, as determinações devem ser realizadas nas mesmas condições e num curto espaço de tempo. A precisão intermédia avalia a variação intra-laboratorial. E a reprodutibilidade avalia a variação inter-laboratorial, utilizando o mesmo método e amostras, mas em condições diferentes, sendo apenas exigida quando se

pretende padronizar o procedimento analítico para utilização como método de referência normalizada.

- A reprodutibilidade exprime a precisão de um método de ensaio realizado em condições experimentais diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio na mesma amostra variando condições de medição, tais como: operadores diferentes; laboratórios diferentes; equipamentos diferentes; intervalo temporal diferente.

No decorrer do estágio a precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermédia, sendo esses parâmetros abordados nos tópicos seguintes.

Repetibilidade - traduz a precisão de um método de ensaio efetuado em condições de ensaio semelhantes, ou seja, ensaios efetuados para a mesma amostra, sob as mesmas condições de medição: mesmo analista; mesmo laboratório; curto intervalo de tempo; mesmo procedimento de medição; mesma instrumentação.

Quando se estuda a repetibilidade no próprio laboratório, esta é determinada por uma série de medições ($n \geq 10$) sobre a mesma amostra, em condições de repetibilidade. O limite de repetibilidade para um nível de confiança de 95% é determinado com base na seguinte equação:

$$r = t \sqrt{2} \cdot S_{ri} = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_{ri} = 2,8 \cdot \sqrt{S_{ri}^2}$$

Equação 3

Onde:

S_{ri} - desvio padrão de repetibilidade associado aos resultados considerados

Precisão intermédia - A precisão intermédia (PI) refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo se varia apenas uma ou várias condições das seguintes: diferentes analistas; diferentes laboratórios; diferentes tempos.

Para quantificar a precisão intermédia, efetua-se n medições em replicado, duplicado ou ensaio único, sobre a amostra em condições pré-definidas, variando os parâmetros experimentais em cada análise. (Relacre, 2000)

A PI é determinada baseando-se nos resultados de t padrões, analisados em replicados, nas mesmas n vezes, conforme a expressão:

$$Si = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}$$

Equação 4

Onde:

Si - desvio padrão da PI;

t - número de amostras ensaiadas;

n - número de ensaios efetuados por amostra;

j - número da amostra;

k - número do resultado obtido para a amostra j ;

y_{jk} - resultado individual para a amostra j ;

\bar{y}_j - média aritmética dos resultados da amostra j ;

Relativamente à validação descrita neste trabalho, a condição escolhida para variar foi o tempo através da realização de duplicados durante 5 dias consecutivos.

1.4.2 Validação direta

A validação direta é efetuada por determinação de parâmetros como a veracidade e a tendência, utilizando material de referência certificado (para avaliar o erro relativo ou teste de hipóteses).

Veracidade - pode ser definida como a aproximação entre o resultado da medição e o valor verdadeiro, sendo este parâmetro afetado sobretudo por erros sistemáticos. No entanto, quando aplicado a uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e componentes de erros sistemáticos. Normalmente para avaliar a veracidade de um método utilizam-se materiais de referência certificados e ensaios interlaboratoriais. (Relacre, 2000)

Os materiais de referência certificados (MRC) são indicados para os processos de validação de métodos de ensaio, dado que apresentam um valor de concentração para cada parâmetro e uma incerteza associada. O guia para aplicação da NP EN ISO/IEC 17025 indica que os MRC devem ser “de marcas comerciais internacionalmente aceites ou preparados no laboratório desde que adequados e estáveis” (IPAC, 2010). O valor obtido na análise de um MRC deve ser comparado ao valor certificado determinando-se o erro e a veracidade da análise. Quando o valor obtido na análise do MRC não se encontra no intervalo de incerteza indicado para o valor certificado, será necessário o laboratório procurar a causa da origem desse desvio. (Relacre, 2000)

Os resultados obtidos podem ser avaliados através de processos suplementares tais como: teste de hipóteses (*t-test*); fator desempenho (*z-score*); erro relativo; erro normalizado.

1.5 Objetivo do trabalho

O objetivo deste trabalho é validar o método de análise de matéria gorda usando um equipamento recentemente adquirido, o *Hydrotec 8000*, para a análise de MG, além da

aquisição de competências de validação de métodos de análise de produtos alimentares, com recurso a técnicas de química clássica e instrumentais em contexto de trabalho num laboratório acreditado. Partindo do objetivo geral, existe um segundo objetivo específico para este trabalho que é a validação de métodos de análise de diferentes matrizes para quantificação de matéria gorda, usando o método em equipamento.

Objetivo específico - Validação do método de análise de matéria gorda em equipamento

Exemplos de matrizes	Matrizes a estudar
<ul style="list-style-type: none"> - Açúcar ou adoçantes; - Produtos de confeitaria (rebuçados); - Doces e geleias; - Chocolate; - Mel, melaço; - Cobertura para tortas. 	Chocolate de barrar (Spread – Bipea 2016/06)
	Chocolate em pó (Cocoa powder)
	Chocolate com pedaços
<ul style="list-style-type: none"> - Pratos cozinhados, sanduiches, pizza; - Molhos simples, molhos com ervas e/ou especiarias, molhos de vegetais, legumes ou frutos; - Sopas; - Batatas fritas. 	Batata frita light
	Tiras de milho
	Carne enlatada (FAPAS - 2015/17)
	Prato peixe (Bipea 2015/77)
	Caldo de galinha
<ul style="list-style-type: none"> - Substitutos de refeição, produtos em pó com elevados níveis de proteína; - Alimentação especial para lactentes; - Suplementos alimentares. 	Farinha láctea
	Suplemento alimentar
	Refeição para bebé
<ul style="list-style-type: none"> - Matérias-primas; - Pré-misturas; - Alimentos compostos. 	Farinha de carne/peixe
	Alimento para gato (Bipea 2015/05)
<ul style="list-style-type: none"> - Sumo de fruta ou vegetais; - Xaropes, concentrados, refrigerantes. 	Bebida de soja de chocolate
<ul style="list-style-type: none"> - Café ou sucedâneos. - Chá, infusões. 	Café moído
	Cappucino
<ul style="list-style-type: none"> - Carnes. - Miudezas. 	Torresmos
	Carne (2014 amostra 731)

- Preparações, conservas e enchidos de carnes ou de miudezas.	Carne (2014 amostra 730)
	Fiambre
	Chouriço (Inter 2000 CA 467)
<ul style="list-style-type: none"> - Cereais (trigo, milho, arroz); - Farinhas, amidos e féculas; - Pão, biscoitos, barras de cereais, pastelaria; - Barras de cereais; - Leguminosas; 	Pastelaria (Bolo mármore)
	Bolacha (Bolacha manteiga)
	Bolacha Maria
	Chocapic (Silliker 2015)
	Pão de forma
	Tosta
	Linhaça
<ul style="list-style-type: none"> - Pimenta; - Sal; - Vinagre; - Mostarda; - Pimentão doce, coentros, louro, salsa, orégãos. 	Mostarda
<ul style="list-style-type: none"> - Frutos frescos e secos, algas; - Produtos hortícolas frescos ou secos; - Preparações e conservas, produtos derivados de frutas; - Frutos desidratados (figos secos, tâmaras secas). 	Algas
	Amendoim (Bipea 2015/05)
	Côco
<ul style="list-style-type: none"> - Sementes oleaginosas; - Óleos e gorduras; - Matéria gorda para barrar; - Maionese. 	Maionese
	Sementes de chia
	Azeite
<ul style="list-style-type: none"> - Leite líquido ou leite em pó; - Manteiga e natas; - Leite fermentado e iogurte; - Queijo fresco e queijo processado; - Soro de leite e caseína; - Gelados. 	Gelado em cones
	Sobremesa láctea
- Peixes;	Conserva em óleo/azeite

<ul style="list-style-type: none"> - Crustáceos; - Moluscos; - Preparações e conservas. 	Peixe fresco (Bipea 2015/01)
	Conserva em água

2. Trabalho laboratorial

Neste capítulo será descrito o procedimento experimental do método clássico de análise de matéria gorda, bem como o procedimento do método de análise de MG em equipamento. Será referido também o processo de preparação das amostras analisadas por ambos os métodos, assim como o tratamento do material utilizado, dado que se tratam de passos importantes para que a análise das amostras seja corretamente realizada, conforme as normas descritas na tabela 1.

2.1 Lavagem do material e equipamentos

2.1.1 Lavagem do material utilizado na análise de matéria gorda

O material de vidro utilizado no método clássico de análise de MG é previamente lavado com detergente, enxaguado com água da torneira e passado por água desionizada. Após o processo de lavagem, é colocado a escorrer e posteriormente é levado à estufa a 60°C até estar completamente seco.

A taça de vidro utilizada no *Hydrotec* é lavada no final de cada dia com detergente, enxaguada com água da torneira e passada por água desionizado, sendo seca ao ar. Os suportes de plástico, por sua vez, são lavados com solução de lixívia/água 1:1, enxaguados com água, escorridos e passados por álcool etílico deixando evaporar o solvente ao ar.

O material de alumínio, nomeadamente os copos de extração, são lavados com detergente, enxaguados com água da torneira e passados por água desionizada e colocados num tabuleiro de boca para baixo para secagem.

A lavagem do material é efetuada diariamente, mais que uma vez ao dia conforme o volume de trabalho. É feita numa sala de lavagens denominada por lavagem química. É feita por técnicas de limpeza especializadas. A manutenção dos equipamentos é feita conforme as recomendações da marca, diariamente e semanalmente.

2.1.2 Lavagem do equipamento de extração

No *Soxtec*, antes da sua primeira utilização diária, deve-se passar éter de petróleo aquecido a 40°C pelos seus condensadores para eliminar qualquer resto de matéria gorda que possa ter ficado retida durante as extrações anteriores.

2.1.3 Manutenção do equipamento de hidrólise automática – *Hydrotec*

O *Hydrotec* necessita de lavagens periódicas dos seus componentes devido à utilização massiva de ácido nos ciclos de hidrólise no equipamento. Como não é possível remover completamente os restos de ácido presente no equipamento, após a sua utilização é necessário que haja a sua remoção da bomba de ácido e das tubagens de transporte de ácido. Assim, aspira-se através de uma mangueira de ácido 2 litros de água morna, para que percorra as tubagens de ácido arrastando qualquer resto de ácido clorídrico presente. Para além da bomba de ácido, é necessário lavar a bomba de fumo do equipamento com a mesma periodicidade, dado que esta funciona como exaustão dos fumos criados durante a hidrólise. Para fazer a lavagem, recorre-se a uma solução de hidróxido de sódio a 3%, que é colocada na taça do *Hydrotec* para que seja aspirada pelas tubagens de fumo e retorne à taça. Por fim, troca-se o filtro de fumos sempre que se efetuar lavagem à bomba de fumos para garantir que o filtro não fique saturado.

2.2 Preparação das amostras

As amostras utilizadas para validação são preparadas na sala de preparação de amostras, independentemente do método, de acordo com o descrito no procedimento interno “Métodos de preparação de amostras para análise”.

No caso de amostras líquidas, a amostra é diretamente retirada da embalagem para recipiente plástico; no caso de amostras sólidas, estas são previamente trituradas no ultra-turrex e transferidas para recipiente plástico; os recipientes são identificados e datados.

2.3 Análise de matéria gorda pelo método de hidrólise usando química clássica

A quantificação de MG pelo método clássico inicia-se pela pesagem da amostra que depende do tipo de matriz em questão, conforme a norma correspondente, apresentando-se a relação na seguinte tabela:

Tabela 2 - Indicação do peso da amostra a usar em função da matriz e respectiva norma ou procedimento correspondente

Matriz	Norma	Quantidade amostra (g)
Carnes, derivados e produtos cárneos	NP 1613:1979	3-5
Pescados e produtos aquacultura	NP 1974:2009	5-10
Cacau e produtos derivados	NP 1719:1981	5-10
Alimento para animais	NP 0876B	2,5
Agroalimentar	PAFQ.069.1	2,5

Processo de hidrólise

Usando uma balança analítica, pesa-se para um matraz esmerilado de 250 mL, a quantidade de amostra correspondente à matriz em análise, segundo a Tabela 2. Na hotte, adiciona-se o ácido clorídrico: no caso de produtos cárneos, usam-se 50mL da solução de HCl 4mol/L; no cacau e produtos derivados, usam-se 55 mL de HCl 25% (m/m) e 45 mL de água desionizada; nas restantes matrizes usa-se 100 mL da solução de HCl 3 mol/L, medidos com proveta.

Adicionam-se 3 pérolas de vidro como reguladores de ebulição, agita-se e colocam-se os matrizes nas mantas de aquecimento, com condensadores adaptados para ebulição. Inicia-se a hidrólise com o aquecimento dos matrizes em intensidade média, reduzindo para o mínimo quando em fervura e contando 60 minutos de ebulição suave.

Completando a hidrólise, deixa-se arrefecer os matrizes e procede-se à filtração por gravidade, com filtro de pregas previamente humedecido com água quente. Lava-se

correntemente a amostra hidrolisada com cerca de 500 mL de água morna, verificando com papel indicador de pH se a amostra se encontra neutra ou ácida. Caso ainda se mostre ácida, a amostra é lavada com mais água morna até se tornar neutra.

Deixa-se filtrar por completo e coloca-se o papel de filtro em placa de petri para secagem à temperatura ambiente (caso a amostra seja urgente, pode-se colocar a placa de petri com o filtro numa estufa a 60°C durante 30 minutos).

Após secagem, a amostra é colocada juntamente com o papel de filtro dentro de uma cápsula de celulose (figura 7) e adaptada ao extrator. Num copo de extração em alumínio (figura 7), previamente tarado com 3 pérolas de vidro, coloca-se 100 mL de éter de petróleo e adapta-se ao extrator.



Figura 7 - Cápsula de celulose e copo de extração em alumínio (autoria própria, 2017)

No apêndice I encontram-se descritos os aparelhos e utensílios utilizados, bem como os reagentes e a preparação de soluções destinadas à análise de matéria gorda pelo método clássico.

2.4 Análise de matéria gorda pelo método em equipamento

Neste método também se inicia o procedimento pela pesagem da amostra, que dependendo da matriz em questão, é pesada em quantidades que variam segundo a percentagem de gordura presente na amostra. Para as amostras sugeridas para análise, seguiram-se indicações recomendadas pela FOSS para análise de MG pelo *Hydrotec* (Tabela 3).

Tabela 3 - Identificação do peso da amostra a usar em função da matriz de acordo com as indicações da marca que comercializa o equipamento

	Percentagem de gordura (%)	Peso da amostra (g)
Carnes, derivados e produtos cárneos	0-10	1,5 – 2 ± 0,1 mg
	10-20	1– 1,5 ± 0,1 mg
	>20	0,5 - 1 ± 0,1 mg
Cacau e produtos derivados	0-10	1,5 – 2 ± 0,1 mg
	10-20	1– 1,5 ± 0,1 mg
	>20	0,5 - 1 ± 0,1 mg
Outras matrizes	0-10	2 – 3 ± 0,1 mg
	10-20	1 - 2 ± 0,1 mg
	>20	0,5 - 1 ± 0,1 mg

Usando uma balança analítica, pesa-se para uma cápsula (figura 8) cerca de 1 grama de celite mais a quantidade de amostra correspondente à matriz em análise, segundo a Tabela 3. Com ajuda de uma vareta, homogeneiza-se a amostra com a celite e com ajuda de algodão, limpa-se a vareta para não deixar resíduos e coloca-se o algodão dentro da cápsula, para que não haja perdas. Encaixam-se as cápsulas no suporte (figura 8) e coloca-se dentro do *Hydrotec* selecionando-se o programa adequado à matriz (Tabelas 4 e 5) e deixa-se correr o ciclo de hidrólise, lavagem e arrefecimento das cápsulas.

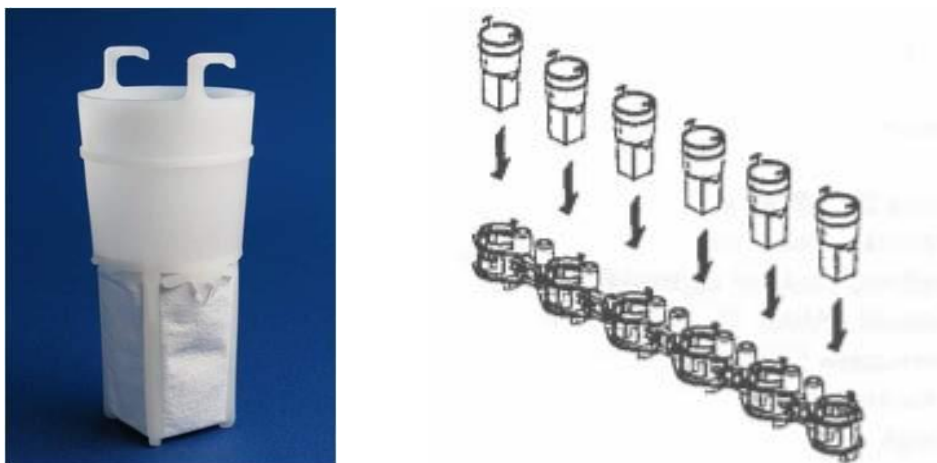


Figura 8 - Hidrocápsula e exemplificação de suporte para hidrocápsulas (FOSS, 2017)

Tabela 4 - Condições de hidrólise do equipamento Hydrotec 8000 para carnes, derivados e produtos cárneos e para outras matrizes

Poder de ebulição	50%
Tempo de ebulição	01:05:00
Arrefecimento	Ligado
Número de lavagens	9

Tabela 5 - Condições de hidrólise do equipamento Hydrotec 8000 para cacau e produtos derivados

Poder de ebulição	50%
Tempo de ebulição	00:15:00
Arrefecimento	Desligado
Número de lavagens	15

Na tabela 4 englobam-se todos os grupos de matrizes analisados no *Hydrotec* exceptuando-se matrizes que pertençam ao grupo das matrizes com cacau e produtos derivados, que estão na tabela 5.

Como acontece no método clássico de análise de MG, a norma das matrizes com cacau e produtos derivados difere das outras normas na hidrólise e lavagem da amostra, que é feita apenas durante 15 minutos e não durante 60 minutos, e é lavada com cerca de 1 L

de água morna e não 500 mL, como sugerem as outras normas, devido ao ácido utilizado para a hidrólise das matrizes de cacau ser mais concentrado, logo necessita de menos tempo de hidrólise para libertar as frações lipídicas da amostra. Então, no *Hydrotec*, o programa usado para esta matriz é diferente do programa utilizado para hidrólise do resto das matrizes, seguindo assim indicações da norma no equipamento que estão de acordo com a norma AOAC 936.15.

Ciclo de hidrólise

Primeiramente ocorre enchimento da taça de hidrólise com HCl até ao nível de pré-ebulição, que é aquecido à temperatura de ebulição e ferve durante 5 minutos. De seguida, uma nova porção de HCl entra na taça e é aquecida a mistura novamente à temperatura de ebulição. A água de arrefecimento é ativada logo de início e a exaustão de fumos inicia antes de se atingir os 40°C.

Após ebulição, água para diluição é adicionada ao HCl até 5 mm acima do nível de ebulição, nível esse em que a bomba de drenagem e a entrada de água cooperam para arrefecer a solução enquanto mantém o nível da mesma constante. A temperatura é ajustada até atingir mais 7°C que a temperatura da água ou até aos 25°C.

O passo seguinte é a lavagem. Em cada lavagem, a taça é esvaziada e as cápsulas são deixadas a gotejar durante 30 segundos antes da próxima lavagem. A água de diluição vai encher a taça até 5 mm acima do nível de ebulição e mantém-se por 15 segundos, para permitir que os filtros das cápsulas sejam devidamente cheios. Para as primeiras 5 lavagens, a água de lavagem é aquecida a 40°C para melhorar a lavagem dos filtros. Após as lavagens, o ciclo termina e leva-se o suporte com as cápsulas à estufa por 12 horas a 60°C.

Após secagem, a cápsula é adaptada ao extrator e adicionam-se 100mL de éter de petróleo ao copo de extração de alumínio (figura 7), previamente tarado com 3 pérolas de vidro e adapta-se ao extrator.

No apêndice II encontra-se descrito os aparelhos e utensílios utilizados, bem como os reagentes e a preparação de soluções destinadas à análise de matéria gorda pelo método em equipamento.

2.5 Extração da matéria gorda pelos dois métodos

No *Soxtec*, equipamento de extração, após adaptação das cápsulas ao equipamento, quer do método clássico quer do método pelo *Hydrotec*, dado que ambas são perfeitamente adaptáveis ao extrator, seleciona-se o programa de extração apropriado que tem a duração de 80 minutos, descrito na tabela seguinte:

Tabela 6 - Programa de temperatura do ciclo de extração do Soxtec 8000

	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Ebulição	20	100
Lavagem	40	-
Recuperação	20	-

Concluído o ciclo de extração, as cápsulas são rejeitadas e os copos que contém a MG extraída são colocados a secar na estufa a 120°C durante 60 minutos. Terminando o tempo de secagem, os copos de alumínio são colocados em exsiccador para arrefecimento e posterior pesagem.

2.6 Controlo de qualidade

Para verificação dos valores obtidos na análise de matéria gorda através do *Hydrotec*, paralelamente à análise das amostras propostas, efetua-se análise a amostras-padrão seguindo o mesmo modo de tratamento das amostras. Estas amostras-padrão são consideradas material de referência certificado fornecido pela *BioMérieux* para ensaios inter-laboratoriais (IEL) no grupo *Mérieux NutriSciences*.

3. Resultado da validação do método para quantificação de matéria gorda

Quando para quantificar analitos se utilizam métodos analíticos, estes devem ser avaliados relativamente à qualidade dos resultados e dos instrumentos utilizados. Assim essa avaliação pode ser realizada através da validação do método de ensaio, que exige que sejam estabelecidos parâmetros de desempenho do método e que estes sejam estudados. Para o método, o laboratório deverá estabelecer critérios mínimos para desempenho do método, ou seja, deverá existir controlo de qualidade aplicado aos resultados para que este apresente a qualidade exigida pelo laboratório. (Relacre, 2000)

Em relação aos resultados, para que estes sejam válidos e apresentem qualidade é necessário não descurar alguns princípios, como: as medições analíticas realizadas devem satisfazer requisitos/critérios previamente definidos; as medições analíticas devem ser realizadas através de métodos previamente testados para garantir que estes se encontram adequados à finalidade a que se destinam; o pessoal técnico responsável pela realização das medições analíticas deve ser competente e qualificado para a realização do trabalho; o laboratório deverá ser avaliado frequentemente; as medições analíticas de determinado laboratório devem ser concordantes com as medições realizadas noutros laboratórios; os procedimentos adotados devem ser bem definidos a nível do controlo de qualidade. (Örnemark, 2014)

Neste capítulo serão apresentados os resultados da validação do método em equipamento para a quantificação de matéria gorda, procedendo-se à análise de inúmeras matrizes apresentadas na tabela de matrizes a estudar nos objetivos deste trabalho.

3.1 Validação do método em equipamento para quantificação de matéria gorda

Para a determinação de matéria gorda através do método em equipamento, procedeu-se à validação dos resultados analíticos obtidos, como limiares analíticos e a precisão do método, que foi avaliada através da repetibilidade e precisão intermédia.

3.1.1 Limite de quantificação

O limiar analítico, no caso deste trabalho, foi estipulado como sendo o limite de quantificação (LQ) do método analítico. Este foi obtido através da seguinte expressão:

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{(MCt - MCg)}{\text{toma máxima}} \times 100$$

Equação 5

Onde:

MCt – massa do copo de extração previamente tarado com 3 reguladores de ebulição

MCg – massa do copo após extração (reguladores de ebulição + extrato)

Toma máxima – maior valor de massa permitido pesar para análise no equipamento

A toma máxima permitida para utilização do equipamento é de 2 g; a diferença máxima de peso permitida entre o copo tarado e o copo após extração é de 0,002 g.

O limite de quantificação obtido para o método foi de 0,1 g/100 g de amostra (N>20).

3.1.2 Precisão

- **Repetibilidade**

Para o estudo da repetibilidade foram efetuados 10 ensaios em replicado sobre 38 amostras diferentes, inseridas em 13 grupos alimentares distintos. A análise foi feita pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, usando o mesmo equipamento e num curto espaço de tempo, ou seja no mesmo dia. Na Silliker, o limite de repetibilidade relativo aceite para este método foi definido como igual ou inferior a 15%.

A repetibilidade foi avaliada através do limite da repetibilidade (r) das várias réplicas da mesma amostra, obtido pelo coeficiente do desvio padrão da repetibilidade, de acordo com a equação 6.

$$\text{Limite repetibilidade} = r = Sr \times 2.8$$

Equação 6

Onde:

Sr – Desvio padrão da amostra

No entanto, para calcular o limite de repetibilidade é necessário ter para cada amostra o desvio padrão associado à repetibilidade (Sr), obtido através da seguinte equação:

$$\text{Desvio padrão} = Sr = \sqrt{s^2}$$

Equação 7

Para calcular o coeficiente de variação de cada amostra foi utilizada a equação seguinte, em que a média e o desvio padrão são relativos às réplicas de cada amostra:

$$\text{Coeficiente de Variação} = CVr = \frac{Sri}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 8

A variância de cada amostra foi obtida de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Variância} = s^2 = \frac{\sum (xi - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Equação 9

Onde:

x_i – Valores obtidos nos ensaios realizados

\bar{x} – Média dos replicados obtidos

n – Número de ensaios realizados

Por fim a média dos ensaios de cada amostra foi obtida através da seguinte equação:

$$Média = \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Equação 10

Onde:

x_i – valores obtidos nos ensaios realizados

n – número de ensaios realizados

Na tabela 7, encontram-se os resultados obtidos para o estudo da repetibilidade na quantificação de matéria gorda pelo método em equipamento, tomando como exemplo uma amostra de cada grupo de matrizes proposto para validação.

Os resultados respeitantes à repetibilidade das outras amostras analisadas estão no anexo III.

Tabela 7- Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade para a quantificação de matéria gorda pelo método de análise em equipamento

Teste de repetibilidade

Grupo de matrizes	Matriz	Ensaio										Média	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
Açúcar e produtos açucarados	Chocolate em pó (g/100g)	10,17	10,28	10,59	10,60	10,52	10,33	10,57	10,48	10,53	10,16	10,42	0,0298	0,1727	1,6569	0,48
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Cordon Bleu (g/100g)	12,70	12,56	12,49	12,77	12,55	12,59	12,70	12,10	12,87	12,92	12,63	0,0535	0,2314	1,8327	0,65
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Farinha láctea (g/100g)	2,05	2,22	2,21	2,01	2,33	2,37	2,16	2,05	2,23		2,183	0,0160	0,1267	5,8038	0,36
Alimentos para animais (simples e compostos)	Alimento para gato (g/100g)	11,88	11,74	11,60	11,49	11,61	11,77	11,32	11,68	11,29	11,08	11,55	0,0616	0,2483	2,1502	0,70
Bebidas não alcoólicas	Bebida de soja (g/100g)	2,40	2,68	2,63	2,53	2,61	2,55	2,66	2,42	2,34	2,63	2,545	0,0145	0,1203	4,7262	0,34
Café, chá, infusões e derivados	Cappucino (g/100g)	15,93	15,78	15,82	15,73	15,90	15,93	15,47	15,94	15,98	15,86	15,83	0,0222	0,1491	0,9414	0,42
Carnes, produtos cárneos e derivados	Fiambre (g/100g)	2,54	2,84	2,75	2,65	2,85	2,71	2,33	2,81	2,58	2,48	2,654	0,0288	0,1697	6,3943	0,48
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Pão de forma (g/100g)	2,16	2,14	2,12	2,05	2,21	2,35	2,14	2,15	2,08	2,08	2,149	0,0073	0,0855	3,9769	0,24

Grupo de matrizes	Matriz	Ensaio										Média	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
Especiarias, condimentos e derivados	Mostarda (g/100g)	0,90	0,99	0,82	0,93	0,95	0,91	0,88	0,91			0,9106	0,0025	0,0495	5,4378	0,14
Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados	Fruitos secos (g/100g)	47,83	47,20	46,62	47,99	47,07	47,76	47,54	47,25	47,76	47,26	47,43	0,1775	0,4213	0,8884	1,2
Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados	Maionese (g/100g)	64,35	60,92	65,31	61,89	64,64	62,57	63,78	64,37	64,92	64,30	63,71	2,0566	1,4341	2,2511	4,0
Leite, produtos lácteos e derivados	Gelado em cones (g/100g)	10,77	10,97	10,85	10,83	10,96	10,88	10,73	10,74	10,96	10,84	10,85	0,0084	0,0917	0,8451	0,26
Produtos da pesca e derivados	Salmão (g/100g)	14,66	14,33	14,57	14,30	14,92	14,23	14,75	14,66	14,59	14,74	14,58	0,0491	0,2216	1,5205	0,62

Através da análise da tabela 7, é possível verificar que os valores obtidos para a repetibilidade variam entre 0,14 g/100 g e 4,0 g/100 g, pertencendo estes valores a amostras de mostarda e de maionese, respetivamente. Analisando os ensaios realizados para cada amostra e apresentados na tabela 7, é possível verificar que a diferença entre quaisquer dois ensaios não ultrapassa nunca o valor do limite de repetibilidade obtido para a respetiva amostra.

Tomando como exemplo os valores obtidos para a quantificação da amostra de chocolate em pó (tabela 8):

Tabela 8 - Valores obtidos para o estudo da repetibilidade na amostra de chocolate em pó

Grupo de matrizes	Matriz	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Limite repetibilidade
Açúcar e produtos açucarados	Chocolate em pó (g/100 g)	10,17	10,28	10,59	10,60	10,52	10,33	10,57	10,48	10,53	10,16	0,48
E2-E1	E3-E2	E4-E3	E5-E4	E6-E5	E7-E6	E8-E7	E9-E8	E10-E9				
0,11	0,31	0,01	0,08	0,19	0,24	0,09	0,05	0,37				

é possível verificar que a diferença entre os valores obtidos entre dois ensaios (valores em absoluto), são inferiores ao valor obtido para o limite de repetibilidade, confirmando assim a afirmação anterior.

Para todas as análises feitas pelo *Hydrotec*, é possível verificar que a diferença entre os valores obtidos consecutivamente é sempre inferior ao limite de repetibilidade (r), sendo possível afirmar que os valores obtidos são concordantes entre medições consecutivas, nas mesmas condições para as matrizes em estudo.

Em relação ao coeficiente de variação, o método de análise apresenta valores relativamente para os diferentes grupos de matrizes que não ultrapassam os 5%, considerando-se assim que a repetibilidade do método em estudo é adequada.

Os valores obtidos para o limite de repetibilidade das amostras são minorados da seguinte forma (Tabela 9):

Tabela 9 - Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade para a quantificação de matéria gorda pelo método de análise em equipamento e forma de efetuar a sua minoração

Matéria gorda (g/100 g)	Limite de repetibilidade relativo (%)	
	Valor calculado	Valor minorado
≤ 10	14,77	14
10 ≤ Matéria gorda ≤ 20	7,061	7
20 ≤ Matéria gorda ≤ 40	6,942	6
≥ 40	5,512	5

Os valores do limite de repetibilidade relativo foram obtidos a partir do cálculo dos limites de repetibilidade de todas as amostras. Estas foram separadas por classes conforme o teor de matéria gorda obtido: ≤ 10, 10 ≤ MG ≤ 20, 20 ≤ MG ≤ 40 e ≥ 40.

Para cada classe apresentada, o limite de repetibilidade foi calculado da seguinte forma:

$$\text{Limite de repetibilidade relativo} = \frac{r}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 11

Onde:

r – limite de repetibilidade de cada amostra

\bar{x} – média dos ensaios de cada amostra

Foi calculado o limite de repetibilidade relativo para cada classe de MG e feita a média desses valores, obtendo-se os valores do limite de repetibilidade relativo apresentados na tabela 9. Como é possível verificar, os valores do limite de repetibilidade relativo para

cada classe, encontram-se abaixo de 15%, conforme estipulado nos critérios internos da empresa para que o método possa ser validado.

No anexo IV encontram-se os valores do limite de repetibilidade relativo para as restantes amostras analisadas.

Teste de Grubbs

Para verificar a inexistência de resultados anómalos, aplica-se o teste de Grubbs, avaliando o valor mínimo e máximo de MG obtido para cada amostra (tabela 10).

Para o teste de Grubbs, o valor mínimo é o resultado mais baixo dos 10 ensaios realizados à amostra, assim como o valor máximo é o resultado mais alto, ambos indicados na tabela 9. Os valores de Gp são calculados a partir das seguintes equações:

$$Gp \text{ Valor mínimo} = \frac{\bar{x} - \text{Valor mínimo}}{Sr} \quad Gp \text{ Valor máximo} = \frac{\bar{x} - \text{Valor máximo}}{Sr}$$

Equação 12

Onde:

\bar{x} – Média dos replicados obtidos

Sr – Variância dos replicados obtidos

Para o valor máximo e mínimo serem aceitáveis, estes devem ser inferiores ou iguais ao valor crítico a 1%. Os valores correspondentes podem ser encontrados na tabela de valores críticos para o teste de Grubbs do anexo V.

Tabela 10 - Resultados obtidos para o teste de Grubbs para a quantificação de matéria gorda pelo método de análise em equipamento

Grupo	Matriz	População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
Açúcar e produtos açucarados	Chocolate em pó	10	2.482	10,16	1,553	Aceitável	10,60	1,002	Aceitável
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Cordon Bleu	10	2.482	12,10	2,257	Aceitável	12,92	1,261	Aceitável
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Farinha láctea	9	2.387	2,007	1,385	Aceitável	2,370	1,476	Aceitável
Alimentos para animais (simples e compostos)	Alimento para gato	10	2.482	11,08	1,876	Aceitável	11,88	1,352	Aceitável
Bebidas não alcoólicas	Bebida de soja	10	2.482	2,339	1,711	Aceitável	2,681	1,142	Aceitável
Café, chá, infusões e derivados	Cappucino	10	2.482	15,47	2,413	Aceitável	15,98	0,973	Aceitável
Carnes, produtos cárneos e derivados	Fiambre	10	2.482	2,33	1,895	Aceitável	2,85	1,148	Aceitável
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Pão de forma	10	2.482	2,05	1,214	Aceitável	2,351	2,378	Aceitável
Especiarias, condimentos e derivados	Mostarda	8	2.274	0,8211	1,807	Aceitável	0,9892	1,588	Aceitável
Frutos, algas, produtos	Fruitos secos	10	2.482	46,62	1,920	Aceitável	47,99	1,329	Aceitável

hortícolas e derivados									
Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados	Maionese	10	2.482	60,92	1,944	Aceitável	65,31	0,8369	Aceitável
Leite, produtos lácteos e derivados	Gelado em cones	10	2.482	10,73	1,399	Aceitável	10,97	1,305	Aceitável
Produtos de pesca e derivados	Salmão	10	2.482	14,23	1,540	Aceitável	14,92	1,549	Aceitável

Analisando os valores mínimos e máximos de cada amostra, é possível verificar a inexistência de resultados inconsistentes, uma vez que o valor obtido para o G experimental é inferior ao valor crítico para um nível de significância de 1%. Assim, para todas as amostras analisadas, após aplicar o teste de Grubbs, foi possível verificar que não foi encontrado nenhum valor anômalo.

Os resultados respeitantes ao teste de Grubbs para as restantes amostras analisadas estão no anexo VI.

- **Precisão intermédia**

Para o estudo da precisão intermédia (PI) foi efetuado um ensaio em duplicado por dia durante 5 dias consecutivos, sobre 38 amostras diferentes. A análise foi feita pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, usando o mesmo equipamento e num curto espaço de tempo, ou seja, em dias consecutivos. O limite de precisão intermédia relativo aceite para este método foi definido pelo laboratório como igual ou inferior a 20%.

A precisão intermédia de um método pode ser avaliada através do limite de precisão intermédia das várias réplicas da mesma amostra, obtido pelo coeficiente do desvio padrão da precisão intermédia (S_i), de acordo com a equação 13:

$$\text{Limite precisão intermédia} = \frac{S_i \times 2,8}{\bar{x}_t} \times 100$$

Equação 13

Onde:

S_i – desvio padrão da precisão intermédia

\bar{x}_t – média aritmética dos N ensaios realizados

Para obter o S_i é necessário calcular primeiramente o quadrado da diferença entre o par de duplicados, assim como a média de cada par de duplicados. Então, calcula-se o S_i a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Desvio Padrão da precisão intermédia} = S_i = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum (E_1 - E_2)^2}$$

Equação 14

Onde:

E_1 – ensaio 1 dos replicados obtidos

E_2 – ensaio 2 dos replicados obtidos

t – população em análise

Na tabela 11, encontra-se o resultado obtido para o estudo da precisão intermédia na quantificação de matéria gorda pelo método em equipamento.

Tomando como exemplo os valores obtidos para a quantificação na amostra de chocolate em pó:

Tabela 11- Resultados obtidos para o estudo da PI para a quantificação de MG pelo método de análise em equipamento no grupo açúcar e produtos açucarados

	Ensaio 1	Ensaio 2	$(E_1 - E_2)$	$(E_1 - E_2)^2$	Média
Chocolate em pó (g/100 g)	10,46	10,40	0,04680	0,002190	10,42
Chocolate em pó (g/100 g)	10,21	10,70	0,4975	0,2475	10,45
Chocolate em pó (g/100 g)	10,77	10,81	0,0425	0,001806	10,79
Chocolate em pó (g/100 g)	10,60	10,55	0,0544	0,002959	10,58
Chocolate em pó (g/100 g)	10,24	10,43	0,1922	3,694E-02	10,34

População 5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i) 0,17
Limite da precisão intermédia 4,5%

Pela análise da tabela 11 verifica-se que o desvio padrão associado à pressão intermédia da amostra apresentada, chocolate em pó, é aceitável uma vez que o valor obtido é inferior ao critério estabelecido pela empresa.

Através da avaliação da precisão intermédia foi possível demonstrar que as medições efetuadas em condições de rotina laboratorial são efetuadas de forma adequada e cumprindo com os critérios previamente estabelecidos. O valor máximo obtido para o limite de precisão intermédia foi de 19%, nomeadamente para a amostra de farinha láctea. Os valores de desvio padrão da precisão intermédia obtidos para todas as amostras foram sempre inferiores a 0,7 podendo assim concluir-se que a precisão intermédia correspondeu aos requisitos especificados.

Os resultados respeitantes à precisão intermédia das outras amostras analisadas estão no anexo VII.

Os valores obtidos para o limite de precisão intermédia das amostras podem ser minorados como indicado na tabela 12.

Tabela 12 - Resultados gerais obtidos para o estudo da precisão intermédia para a quantificação de matéria gorda pelo método de análise em equipamento e forma de efetuar a sua minoração

Limite de precisão intermédia relativo (%)		
Matéria gorda (g/100 g)	Valor calculado	Valor minorado
≤ 10	9,993	9
$10 \leq \text{Matéria gorda} \leq 20$	4,604	4
$20 \leq \text{Matéria gorda} \leq 40$	1,737	1
≤ 40	0,02126	0

Os valores do limite de precisão intermédia relativo foram obtidos a partir do cálculo dos limites de precisão intermédia de todas amostras. Estas foram separadas por classes conforme o teor de matéria gorda obtido: ≤ 10 , $10 \leq \text{MG} \leq 20$, $20 \leq \text{MG} \leq 40$ e ≥ 40 . Para cada classe apresentada, o limite de precisão intermédia relativo foi calculado como indicado anteriormente, obtendo-se os valores da tabela 12. O limite de precisão intermédia obtido para cada classe estudada foi inferior ao valor definido pelo laboratório para validação do método.

No anexo VIII encontram-se as tabelas com o limite de repetibilidade relativo para as restantes amostras analisadas. Analisando todo o conjunto de resultados obtidos nas amostras para a precisão intermédia, obtém-se o valor do desvio padrão da precisão intermédia e limite de precisão intermédia do método, apresentados na tabela 13:

Tabela 13 - Resultados obtidos para o estudo da PI para a quantificação de MG pelo método de análise em equipamento

População:	206
Desvio padrão da precisão intermédia (Si):	0,24
Limite de precisão intermédia:	3,3%

O limite de precisão obtido é relativamente baixo, bem como o desvio padrão associado à precisão intermédia e cumpre com os critérios estabelecidos pela empresa. Então é possível afirmar que o método de análise de matéria gorda pelo equipamento apresenta boa precisão intermédia.

3.1.3 Veracidade

No âmbito desta validação, a veracidade foi demonstrada através da comparação dos resultados obtidos com a análise de materiais de referência certificados (MRC). Os limites apresentados como inferior e superior, são valores definidos por ensaio interlaboratorial e que se encontram indicados nos certificados de cada MRC estudado.

Na tabela 14 encontram-se os valores obtidos e os valores de referência para cada amostra certificada:

Tabela 14 - Resultados obtidos nas matrizes certificadas analisadas pelo método em equipamento

Matriz	Valor medido (g/100 g)	Valor certificado (g/100 g)	Limite inferior (g/100 g)	Limite superior (g/100 g)	Avaliação da veracidade
BIPEA 2016 – Spread	34,03	33,70	32,10	35,30	OK
FAPAS T01104 Canned meat	17,11	17,00	16,00	18,00	OK
BIPEA 2016 - Corden bleu	12,60	12,20	11,30	13,10	OK
BIPEA 2015 - Cat food	11,60	11,90	10,90	12,90	OK
LGC Meat 730	24,92	24,78	23,00	26,60	OK
LGC Meat 731	19,16	19,32	17,90	20,70	OK
Silliker 2015 - Breakfast cereal	10,57	10,85	9,430	12,27	OK
BIPEA 2014 - Dried fruits	47,43	47,60	45,60	49,6	OK

Como é possível verificar através da análise da tabela 14, os valores obtidos para a MG nas amostras certificadas encontram-se dentro dos limites inferior e superior apresentado nos certificados dos MRC. Assim, com base nos ensaios realizados e nos resultados obtidos, demonstra-se que os valores de veracidade obtidos para cada MRC

estudado cumprem com os critérios estabelecidos pelo laboratório para as matrizes analisadas.

3.2 Resumo dos parâmetros avaliados na validação do método

No âmbito deste estágio foi possível fazer a validação do método de quantificação de matéria gorda através do método em equipamento para 38 matrizes. O estudo de validação deste método foi executado com base no procedimento de análises físico-químicas da empresa (PAFQ 0.69). A tabela 15 apresenta os parâmetros de desempenho selecionados para o método em questão, assim como os resultados obtidos.

Através do estudo da precisão do método foi possível demonstrar que o método apresenta coeficientes de variação (repetibilidade e precisão intermédia) adequados para as amostras em estudo, uma vez que os valores obtidos cumprem com os critérios estabelecidos pela empresa. Valores mais elevados dos coeficientes de variação podem ser explicados pela menor homogeneidade das amostras (por exemplo, bebida de soja). A aplicação do teste de Grubbs não identificou resultados anómalos no estudo da repetibilidade.

Através da análise de materiais de referência foi possível verificar que o método de análise de matéria gorda em equipamento é um método exato, visto que os resultados da análise das amostras de referência analisadas são coerentes com os valores dos certificados das respetivas amostras e cumprem com os critérios de aceitação estabelecidos pela empresa.

Apesar de a validação ter sido realizada com sucesso e todas as matrizes analisadas terem sido corretamente validadas, existem alguns grupos de matrizes que não são aconselháveis analisar no *Hydrotec*. É o caso de matrizes dos grupos de alimentos para animais, carnes e peixes. Este tipo de matriz não é homogénea, o que dificulta a hidrólise, tornando o processo muito demorado e implicando que seja necessário repetir as análises. Assim, estas matrizes deverão continuar a ser analisadas pelo método clássico de análise de MG.

Tabela 15 - Parâmetros de desempenho para a quantificação de matéria gorda através de método em equipamento

Parâmetros de validação	Requisito	Valor obtido	Avaliação
Repetibilidade	≤15%	14% para $MG \leq 10$ g/100 g 10% para $10 \leq MG \leq 20$ g/100 g 7% para $20 \leq MG \leq 40$ g/100 g 5% para $MG \geq 40$ g/100 g	Valor obtido por cálculo
Precisão intermédia	≤10%	9% para $MG \leq 10$ g/100 g 4% para $10 \leq MG \leq 20$ g/100 g 1% para $20 \leq MG \leq 40$ g/100 g 2% para $MG \geq 40$ g/100 g	Valor obtido por cálculo
Veracidade	Com base nos ensaios realizados e nos resultados obtidos, demonstra-se que os valores de veracidade obtidos cumprem com os critérios estabelecidos pelo laboratório para todas as matrizes.		
Limite de quantificação	n.a.	0,1 g/100 g	Definido com base na toma máxima e na diferença entre copos tarados e após extração

4.Considerações finais

O Estágio decorreu na Silliker Portugal S.A. e teve como principal objetivo a validação de um método para determinação de matéria gorda usando um equipamento recentemente adquirido pela empresa. Os resultados da determinação da matéria gorda usando o novo método, permitem verificar que foi possível validar as 38 matrizes propostas, cumprindo os objetivos do trabalho.

Neste trabalho efetuou-se o estudo da validação de um método de análise de matéria gorda em equipamento, o *Hydrotec*, para futuramente este ser adotado pela empresa em substituição do método clássico de análise de matéria gorda. Em relação à quantificação da matéria gorda, após a validação estar concluída, a análise de amostras de clientes passou a ser feita pelo *Hydrotec* em praticamente todas as matrizes, excluindo os alimentos para animais, carnes e peixes, demonstrando confiança da empresa na validação efetuada. Assim, este Estágio permitiu à Silliker Portugal S.A. a utilização do *Hydrotec* para análise de matéria gorda.

Em termos pessoais, a realização deste Estágio nesta empresa permitiu a aquisição de novos conhecimentos em diferentes áreas e o desenvolvimento de novas competências a nível laboratorial, permitindo-me crescer e aprender com os desafios diários. Foi um contato diário e direto com o mundo laboral, com resolução de problemas reais em contexto de laboratório, sendo uma experiência bastante enriquecedora quer a nível pessoal, quer a nível profissional.

Referências bibliográficas

Ahmed, M., Pickova, J., Ahmad, T., Liaquat, M., Farid, A., & Jahangir, M. 2016. Oxidation of lipids in foods. *Sarhad Journal of Agriculture*, 32(3): 230-238.

Analysis of Lipids. [Online]

Available at: <http://www-unix.oit.umass.edu/~mcclemen/581Lipids.html>

[Acedido em 17 07 2017].

AOAC, 1990. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 15th ed. *Arlington, VA, USA*.

Blei, I. O. G., 1999. Organic and Biochemistry: Connecting chemistry to your life. *W.H. Freeman*, pp. 332-358.

Blum-Fretz, C., Baumann, A. & Feifel, S., 2007. *Fat Determination: Comparison between Soxhlet and Hot Extraction using the Extraction Units E-812/E-816*.

Eurachem, 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.

FOSS, 2014. Soxtec/Hydrotec 8000 Total Fat Solution, brochura.

FOSS, 2017. *Hydrotec 8000.* [Online]

Available at: <https://www.fossanalytics.com/en/products/hydrotec-8000>

[Acedido em 27-05-2017].

FOSS, 2014. Extraction of fat in Cacao products in agreement with AOAC 963.15.

ICH, 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology. pp. 9-10.

Inmetro, 2007. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008. pp. 10-19.

IPAC, 2010. Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025 OGC001.

IPQ, 2007. NP EN ISO/IEC 17025 - Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.

ISO, 2002. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions*.

Luthria, D. L., 2004. Soxtec: Its Principles and Applications. In: *Oil Extraction and Analysis, Critical Issues and Comparative Studies*. AOCS Press, pp. 11-24.

Luque De Castro, M.D., Priego-Capote, F., 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, Volume 1217, 2383–2389.

Thompson, M., Ellison, S., Wood, R., 2002. Harmonized Guidelines for single - Laboratory validation of methods of analysis. Volume 74, 835–855.

MIS, 1998. Crude Fat Determination - Soxhlet Method. *Meat technology*, pp. 1-3.

NutriSciences, M., 2016. [Online]
Available at: <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/grupo/historia>
[Acedido em 22-10-2016].

NutriSciences, M., 2016. *Os serviços*. [Online]
Available at: <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/servicos/seguranca-e-qualidadealimentar/os-nossos-servicos>
[Acedido em 22-10-2016].

NutriSciences, M., 2016. *Silliker Portugal*. [Online]
Available at: <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/silliker/sobre-a-silliker/silliker-Portugal>
[Acedido em 22-10-2016].

OMS, 2016. *Relatório pericial sobre dieta alimentar, nutrição e prevenção de doenças crónicas*. [Online]
Available at: http://who.int/nutrition/publications/pressrelease32_pt.pdf
[Acedido em 22-10-2016].

Örnemark, B. M. a. U., 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.

Pomeranz, Y., 1994. Food Analysis: Theory and Practice 3^a ed. *Chapman & Hall: ITP*, pp. 389-395.

Relacre, 1996. Relacre Guia 3 - Validação de resultados em laboratórios químicos.

Relacre, 2000. Guia Relacre 13 - Validação de métodos internos de ensaio em análise química.

Shahidi, F., 2001. Extraction and Measurement of Total Lipids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, pp. D1.1.1-D1.1.11.

Sikorski, Z. E. K. A., 2002. Chemical and Functional Properties of Food Lipids. *Taylor & Francis*.

Soxhlet, F., 1879. Dinglers' Polyt. Volume 232, p. 461.

T. Pérez-Palacios, Ruiz, J., Martín, D., Muriel, E., Antequera, T., 2008. Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products. *Food Chemistry*, 1025–1029.

Taylor, J. K., 1987. Quality assurance of chemical measurements. pp. 7-10.

Anexo I – Análise por método clássico de matéria gorda

Aparelhos e utensílios:

- Balança analítica com calibração interna: A&D GR-200, com 0,1 mg resolução;
- Extrator MG: Soxtec 8000, FOSS;
- Exsicador;
- Manta aquecimento com sistema de refluxo;
- Matrizes esmerilados 250 mL;
- Matrizes 500 mL;
- Condensadores;
- Funis plásticos;
- Provetas 100 mL;
- Caixas petri;
- Cartuchos de celulose para extração;
- Copos extração em alumínio;
- Papel de filtro;
- Filtros pregueados;
- Algodão;
- Reguladores de ebulição: pérolas de vidro.

Reagentes:

- Ácido clorídrico a 37%, VWR;
- Éter de petróleo 40-60°C, VWR;
- Água desionizada.

Nota: os reagentes devem ser de qualidade analítica.

Preparação de soluções

Solução de ácido clorídrico a 25%

Para balão volumétrico de 1000 mL, medir 500 mL de ácido clorídrico da solução comercial e juntar 250 mL de água desionizada, homogeneizar, transferir para frasco de vidro escuro e rotular.

Solução de ácido clorídrico 3 mol/L

Para um balão volumétrico de 2000 mL, medir 500 mL de ácido clorídrico da solução comercial, aferir com água desionizada. Transferir para frasco de plástico e rotular.

Solução de ácido clorídrico 4 mol/L

Para balão volumétrico de 2000 mL, medir 600 mL de ácido clorídrico da solução comercial, juntar 1200 mL de água desionizada e homogeneizar. Transferir para frasco de plástico e rotular.

Nota: as soluções 3 e 4 mol/L devem ser preparadas diariamente, para garantir a qualidade da hidrólise.

Anexo II - Análise de matéria gorda por método em equipamento

Aparelhos e utensílios:

- Balança analítica com calibração interna: A&D GR-200, com 0,1mg resolução;
- Hidrolisador: *Hydrotec* 8000, FOSS;
- Extrator MG: *Soxtec* 8000, FOSS;
- Exsicador;
- Proveta 100mL;
- Algodão;
- Cápsulas de material inerte – hidrocápsulas;
- Copos extração em alumínio;
- Celite;
- Reguladores de ebulição: pérolas de vidro.

Reagentes

- Ácido clorídrico a 37%, VWR;
- Éter de petróleo 40-60°C, VWR;
- Água desionizada.

Nota: os reagentes devem ser de qualidade analítica.

Preparação de soluções

Solução de ácido clorídrico 4 mol/L

Para balão volumétrico de 2000 mL, medir 600 mL de ácido clorídrico da solução comercial, juntar 1200 mL de água desionizada e homogeneizar.

Nota: a solução deve ser preparada diariamente para garantir a qualidade da hidrólise.

Anexo III – Estudo da repetibilidade

Teste de repetibilidade para todas as amostras

														Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade
Matriz		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Média	Variância			de
Açúcar, produtos açucarados	Chocolate com pedaços	36,57	36,26	36,45	36,92	36,82						36,60	0,0720	0,2684	0,7332	0,7514
	Chocolate em pó	10,17	10,28	10,59	10,60	10,52	10,33	10,57	10,48	10,53	10,16	10,42	0,0298	0,1727	1,6569	0,4836
	Chocolate de barrar	35,17	33,33	34,04	34,09	33,81	36,57	34,59	33,97	34,14	34,63	34,43	0,8140	0,9022	2,6202	2,5262
Alimentos confeccionado s e pré- confeccionado s	Batata frita light	27,86	28,93	28,87	27,93	27,12	28,87	30,16	27,94	33,57	27,89	29,91	11,2015	3,3469	11,1883	9,3712
	Caldo de galinha	19,33	18,50	19,31	19,65	19,77	19,40	19,58	19,28	19,64	18,48	19,29	0,2058	0,4536	2,3509	1,2701
	Canned meat	17,11	17,18	17,56	17,36	17,39	16,80	16,91	16,96	16,87	17,05	17,12	0,0631	0,2512	1,4675	0,7034
	Cordon Bleu	12,70	12,56	12,49	12,77	12,55	12,59	12,70	12,10	12,87	12,92	12,63	0,0535	0,2314	1,8327	0,6479
	Tiras de milho	32,61	31,43	31,07	31,66	31,74	31,28	31,35	31,30	32,82	31,49	31,68	0,3401	0,5831	1,8411	1,6328
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Farinha láctea	2,05	2,22	2,21	2,01	2,33	2,37	2,16	2,05	2,23		2,183	0,0160	0,1267	5,8038	0,3547
	Refeição para bebé	2,68	2,67	2,81	2,50	2,61	2,02	2,08	2,61	2,73		2,524	0,0785	0,2801	11,1003	0,7844
	Suplemento alimentar	4,76	4,31	4,84	4,40	4,08						4,478	0,1022	0,3197	7,1386	0,8950

Matriz		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Média	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade de
Alimentos para animais (simples e compostos)	Alimento para gato	11,88	11,74	11,60	11,49	11,61	11,77	11,32	11,68	11,29	11,08	11,55	0,0616	0,2483	2,1502	0,6951
	Farinha de carne	11,37	12,45	11,28	12,73	12,23	11,31	12,31	11,86	11,79		11,93	0,2849	0,5338	4,4758	1,4946
Bebidas não alcoólicas	Bebida de soja	2,40	2,68	2,63	2,53	2,61	2,55	2,66	2,42	2,34	2,63	2,544	0,0145	0,1203	4,7262	0,3367
Café, chá, infusões e derivados	Café moído	10,84	11,01	10,68	11,11	10,59	10,68	11,25	11,39	10,31	11,33	10,92	0,1262	0,3553	3,2541	0,9948
	Cappuccino	15,93	15,78	15,82	15,73	15,90	15,93	15,47	15,94	15,98	15,86	15,83	0,0222	0,1491	0,9414	0,4174
Carnes, produtos cárneos e derivados	Inter 2000 CA-467 Cárnico	32,14	32,76	32,68	33,54	32,04	32,18	33,04	33,07	32,90		32,70	0,2551	0,5051	1,5444	1,4143
	Fiambre	2,54	2,84	2,75	2,65	2,85	2,71	2,33	2,81	2,58	2,48	2,654	0,0288	0,1697	6,3943	0,4751
	Meat 730	25,22	24,87	25,82	24,30	23,59	25,36	25,00	25,18	24,98		24,92	0,4152	0,6444	2,5854	1,8042
	Meat 731	19,04	19,32	19,02	19,00	19,09	20,99	18,70	18,34	19,93		19,27	0,5982	0,7734	4,0140	2,1656
	Torresmo	12,48	11,88	12,82	11,85	12,14	12,90	11,77	12,11	11,67	11,50	12,11	0,2304	0,4800	3,9628	1,3440
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Bolacha de manteiga	16,03	16,02	16,31	16,04	16,03	16,68	16,49	16,21	16,02	16,30	16,21	0,0538	0,2320	1,4311	0,6496
	Bolacha Maria	9,38	9,27	9,23	9,23	9,09	9,49	9,40	9,12	9,02	9,36	9,259	0,0228	0,1511	1,6317	0,4231
	Cereal Peq.	10,60	10,78	10,66	10,53	10,57	10,65	10,55	10,36	10,42	10,80	10,60	0,0199	0,1410	1,3316	0,3949
	Linhaça	42,92	43,73	40,87	43,19	43,78	44,69	44,81	44,69	43,34	46,01	43,81	1,9395	1,3927	3,1794	3,8995
	Pão de forma	2,16	2,14	2,12	2,05	2,21	2,35	2,14	2,15	2,08	2,08	2,149	0,0073	0,0855	3,9769	0,2393

Matriz		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Média	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade de
	Pastelaria	20,16	20,47	20,05	20,98	20,04						20,34	0,1580	0,3975	1,9543	1,1130
	Tosta	12,25	12,03	12,20	12,28	12,08						12,17	0,0118	0,1086	0,8926	0,3041
Especiarias, condimentos e derivados	Mostarda	0,90	0,99	0,82	0,93	0,95	0,91	0,88	0,91			0,9106	0,0025	0,0495	5,4378	0,1386
Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados	Alga	9,23	9,46	9,35	9,53	9,47						9,408	0,0142	0,1193	1,2676	0,3339
	Fruitos secos	47,83	47,20	46,62	47,99	47,07	47,76	47,54	47,25	47,76	47,26	47,43	0,1775	0,4213	0,8884	1,1798
	Côco	68,22	68,85	68,03	68,82	68,85	68,15	68,81	68,25	67,20	68,68	68,39	0,2801	0,5292	0,7739	1,4818
Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados	Azeite	96,60	96,96	92,50	96,56	92,33						94,99	5,5655	2,3591	2,4836	6,6056
	Maionese	64,35	60,92	65,31	61,89	64,64	62,57	63,78	64,37	64,92	64,30	63,71	2,0566	1,4341	2,2511	4,0155
	Sementes de chia	37,44	37,61	37,53	37,01	35,66						37,05	0,6558	0,8098	2,1858	2,2675
Leite, produtos lácteos e derivados	Gelado em cones	10,77	10,97	10,85	10,83	10,96	10,88	10,73	10,74	10,96	10,84	10,85	0,0084	0,0917	0,8451	0,2568
	Sobremesa láctea	15,44	14,05	15,84	14,21	11,10	12,89	15,51	13,29	13,68	14,04	14,01	2,0081	1,4171	10,1187	3,9678
Produtos de pesca e derivados	Conserva em água	0,8001	0,8055	0,7054	0,7573	0,7226						0,7582	00,2012	0,4183	2,823	1,1714
	Conserva óleo	14,53	14,85	13,83	14,60	15,08	15,07	14,97	15,17	15,25	14,86	14,820	0,1733	0,4163	2,8091	1,1657
	Salmão	14,66	14,33	14,57	14,30	14,92	14,23	14,75	14,66	14,59	14,74	14,576	0,0491	0,2216	1,5205	0,6205

Anexo IV – Estudo da repetibilidade relativa

Classe Matéria Gorda ≤ 10 g/100 g

Cálculo de repetibilidade relativa

Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Média	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade	Limite de repetibilidade de relativo
Refeição para bebé	2,68	2,67	2,81	2,50	2,61	2,02	2,08	2,61	2,73		2,524	0,0785	0,2801	11,10	0,7844	31,0
Suplemento alimentar	4,76	4,31	4,84	4,40	4,08						4,478	0,1022	0,3197	7,139	0,8950	19,9
Bebida de soja	2,40	2,68	2,63	2,53	2,61	2,55	2,66	2,42	2,34	2,63	2,545	0,0145	0,1203	4,727	0,3367	13,2
Fiambre	2,54	2,84	2,75	2,65	2,85	2,71	2,33	2,81	2,58	2,48	2,654	0,0288	0,1697	6,394	0,4751	17,9
Bolacha Maria	9,38	9,27	9,23	9,23	9,09	9,49	9,40	9,12	9,02	9,36	9,260	0,0228	0,1511	1,632	0,4231	4,57
Pão de forma	2,16	2,14	2,12	2,05	2,21	2,35	2,14	2,15	2,08	2,08	2,149	0,0073	0,0855	3,977	0,2393	11,1
Mostarda	0,90	0,99	0,82	0,93	0,95	0,91	0,88	0,91			0,9106	0,0025	0,0495	5,438	0,1386	15,2
Alga	9,23	9,46	9,35	9,53	9,47						9,408	0,0142	0,1193	1,268	0,3339	3,55
Farinha láctea	2,05	2,22	2,21	2,01	2,33	2,37	2,16	2,05	2,23		2,183	0,0160	0,1267	5,804	0,3547	16,2
Valor médio limite repetibilidade relativo																14,8
Valor minorado																14

Classe 10 g ≤ Matéria Gorda ≤ 20 g/100 g

Cálculo de repetibilidade relativa

Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Média	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade	Limite de repetibilidade relativo
Chocolate em pó	10,17	10,28	10,59	10,60	10,52	10,33	10,57	10,48	10,53	10,16	10,42	0,0298	0,1727	1,657	0,4836	4,64
Caldo de galinha	19,33	18,50	19,31	19,65	19,77	19,40	19,58	19,28	19,64	18,48	19,29	0,2058	0,4536	2,351	1,270	6,58
Canned meat	17,11	17,18	17,56	17,36	17,39	16,80	16,91	16,96	16,87	17,05	17,12	0,0631	0,2512	1,468	0,7034	4,11
Cordon Bleu	12,70	12,56	12,49	12,77	12,55	12,59	12,70	12,10	12,87	12,92	12,62	0,0535	0,2314	1,833	0,6479	5,13
Cat food	11,88	11,74	11,60	11,49	11,61	11,77	11,32	11,68	11,29	11,08	11,55	0,0616	0,2483	2,150	0,6951	6,02
Farinha de carne	11,37	12,45	11,28	12,73	12,23	11,31	12,31	11,86	11,79		11,93	0,2849	0,5338	4,476	1,495	12,5
Café moído	10,84	11,01	10,68	11,11	10,59	10,68	11,25	11,39	10,31	11,33	10,92	0,1262	0,3553	3,254	0,9948	9,11
Cappucino	15,93	15,78	15,82	15,73	15,90	15,93	15,47	15,94	15,98	15,86	15,83	0,0222	0,1491	0,941	0,4174	2,64
Meat 731	19,04	19,32	19,02	19,00	19,09	20,99	18,70	18,34	19,93		19,27	0,5982	0,7734	4,014	2,166	11,2
Torresmo	12,48	11,88	12,82	11,85	12,14	12,90	11,77	12,11	11,67	11,50	12,11	0,2304	0,4800	3,963	1,344	11,1
Bolacha de manteiga	16,03	16,02	16,31	16,04	16,03	16,68	16,49	16,21	16,02	16,30	16,21	0,0538	0,2320	1,431	0,6496	4,01
Breakfast cereals	10,60	10,78	10,66	10,53	10,57	10,65	10,55	10,36	10,42	10,80	10,59	0,0199	0,1410	1,332	0,3949	3,73
Tosta	12,25	12,03	12,20	12,28	12,08						12,17	0,0118	0,1086	0,8926	0,3041	2,50
Gelado em cones	10,77	10,97	10,85	10,83	10,96	10,88	10,73	10,74	10,96	10,84	10,85	0,0084	0,0917	0,8451	0,2568	2,37
Sobremesa láctea	15,44	14,05	15,84	14,21	11,10	12,89	15,51	13,29	13,68	14,04	14,00	2,0081	1,417	10,12	3,968	28,3
Conserva em óleo	14,53	14,85	13,83	14,60	15,08	15,07	14,97	15,17	15,25	14,86	14,82	0,1733	0,4163	2,810	1,166	7,87
Salmão	14,66	14,33	14,57	14,30	14,92	14,23	14,75	14,66	14,59	14,74	14,58	0,0491	0,2216	1,521	0,6205	4,26
Sementes de Chia	37,44	37,61	37,53	37,01	35,66						37,05	0,6575	0,8108	2,189	2,270	6,13
Valor médio limite repetibilidade relativo																7,06
Valor minorado																7

Classe 20 g ≤ Matéria Gorda ≤ 40 g/100 g

Cálculo de repetibilidade relativa

Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Média	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade	Limite de repetibilidade relativo
Chocolate com pedaços	36,57	36,26	36,45	36,92	36,82						36,60	0,0720	0,2684	0,7332	0,7514	2,05
Spread	35,17	33,33	34,04	34,09	33,81	36,57	34,59	33,97	34,14	34,63	34,43	0,8140	0,9022	2,620	2,5262	7,34
Batata frita light	27,86	28,93	28,87	27,93	27,12	28,87	30,16	27,94	33,57	27,89	28,91	3,3961	1,843	6,374	5,1600	17,8
Tiras de milho	32,61	31,43	31,07	31,66	31,74	31,28	31,35	31,30	32,82	31,49	31,68	0,3401	0,5831	1,841	1,6328	5,15
Inter 2000 CA-467 Cárnico	32,14	32,76	32,68	33,54	32,04	32,18	33,04	33,07	32,90		32,71	0,2551	0,5051	1,544	1,4143	4,32
Meat 730	25,22	24,87	25,82	24,30	23,59	25,36	25,00	25,18	24,98		24,92	0,4152	0,6444	2,586	1,8042	7,24
Pastelaria	20,16	20,47	20,05	20,98	20,04						20,34	0,1580	0,3975	1,954	1,1130	5,47
Sementes de Chia	37,44	37,61	37,53	37,01	35,66						37,05	0,6575	0,8108	2,189	2,2703	6,13
Valor médio limite repetibilidade relativo																6,94
Valor minorado																6

Classe Matéria Gorda ≥ 40 g/100 g

Cálculo de repetibilidade relativa

Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Média	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade	Limite da repetibilidade e relativo
Linhaça	42,92	43,73	40,39	43,19	43,78	44,69	44,81	44,69	43,34	46,01	43,7547	2,2755	1,5085	3,4476	4,2238	9,65
Fruits secos	47,83	47,20	46,62	47,99	47,07	47,76	47,54	47,25	47,76	47,26	47,4280	0,1782	0,4221	0,8899	1,1818	2,49
Côco	68,22	68,85	68,03	68,82	68,85	68,15	68,81	68,25	67,20	68,68	68,3860	0,2800	0,5292	0,7738	1,4817	2,17
Azeite	96,60	96,96	92,50	96,56	92,33						94,9900	5,5534	2,3566	2,4809	6,5984	6,95
Maionese	64,35	60,92	65,31	61,89	64,64	62,57	63,78	64,37	64,92	64,30	63,7050	2,0537	1,4331	2,2495	4,0126	6,30
Valor médio limite repetibilidade relativo																5,51
Valor minorado																5

Anexo V – Valores críticos para o Teste de Grubbs

Valores críticos para Teste de Grubbs		
p	Acima 1%	Acima 5%
3	1,555	1,555
4	1,496	1,481
5	1,764	1,715
6	1,973	1,887
7	2,139	2,02
8	2,274	2,126
9	2,387	2,215
10	2,482	2,29
11	2,564	2,355
12	2,636	2,412
13	2,699	2,462
14	2,755	2,507
15	2,806	2,549
16	2,852	2,585
17	2,894	2,62
18	2,932	2,651
19	2,968	2,681
20	3,001	2,709
21	3,031	2,733
22	3,060	2,758
23	3,087	2,781
24	3,112	2,802
25	3,135	2,822
26	3,157	2,841
27	3,178	2,859
28	3,199	2,876
29	3,218	2,893
30	3,236	2,908
31	3,253	2,924
32	3,270	2,938
33	3,286	2,952
34	3,301	2,965
35	3,316	2,979
36	3,330	2,991
37	3,343	3,003
38	3,356	3,014
39	3,369	3,025
40	3,381	3,036

(ISO, 2002)

Anexo VI – Valores obtidos para o Teste de Grubbs

Teste Grubbs para todas as amostras

Grupo	Matriz	Valor crítico 1%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
Açúcar, produtos açucarados	Chocolate com pedaços	1,764	36,26	1,271	Aceitável	36,92	1,174	Aceitável
	Chocolate em pó	2,482	10,16	1,553	Aceitável	10,60	1,002	Aceitável
	Chocolate barrar	2,482	33,33	1,220	Aceitável	36,57	2,362	Aceitável
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Batata frita light	2,482	27,12	0,835	Aceitável	37,93	2,394	Aceitável
	Caldo de galinha	2,482	18,48	1,790	Aceitável	19,77	1,046	Aceitável
	Canned meat	2,482	16,80	1,265	Aceitável	17,56	1,742	Aceitável
	Cordon Bleu	2,482	12,10	2,257	Aceitável	12,92	1,261	Aceitável
	Tiras de milho	2,482	31,07	1,032	Aceitável	32,82	1,971	Aceitável
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Farinha láctea	2,387	2,01	1,385	Aceitável	2,37	1,476	Aceitável
	Refeição para bebé	2,387	2,02	1,781	Aceitável	2,81	1,007	Aceitável
	Suplemento alimentar	1,764	4,08	1,255	Aceitável	4,84	1,144	Aceitável
Alimentos para animais (simples e compostos)	Alimento para gato	2,482	11,08	1,876	Aceitável	11,88	1,352	Aceitável
	Farinha de carne	2,387	11,28	1,210	Aceitável	12,73	1,509	Aceitável
Bebidas não alcoólicas	Bebida de soja	2,482	2,34	1,711	Aceitável	2,68	1,142	Aceitável
Café, chá, infusões e derivados	Café moído	2,482	10,31	1,707	Aceitável	11,39	1,319	Aceitável
	Cappucino	2,482	15,47	2,413	Aceitável	15,98	0,973	Aceitável
Carnes, produtos cárneos e derivados	Inter 2000 CA-467 Cárnico	2,387	32,04	1,321	Aceitável	33,54	1,655	Aceitável
	Fiambre	2,482	2,33	1,895	Aceitável	2,85	1,148	Aceitável
	Meat 730	2,387	23,59	2,067	Aceitável	25,82	1,391	Aceitável
	Meat 731	2,387	18,34	1,200	Aceitável	20,99	2,220	Aceitável
	Torresmo	2,482	11,50	1,284	Aceitável	12,90	1,632	Aceitável
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Bolacha de manteiga	2,482	16,02	0,845	Aceitável	16,68	2,019	Aceitável
	Bolacha Maria	2,482	9,02	1,597	Aceitável	9,49	1,534	Aceitável
	Breakfast cereals	2,482	10,36	1,658	Aceitável	10,80	1,483	Aceitável
	Linhaça	2,482	40,87	2,107	Aceitável	46,01	1,588	Aceitável
	Pão de forma	2,482	2,05	1,214	Aceitável	2,35	2,378	Aceitável

	Pastelaria	1,764	20,04	0,760	Aceitável	20,98	1,605	Aceitável
	Tosta	1,764	12,03	1,247	Aceitável	12,28	1,047	Aceitável
Especiarias, condimentos e derivados	Mostarda	2,274	0,82	1,807	Aceitável	0,99	1,588	Aceitável
Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados	Alga	1,764	9,23	1,475	Aceitável	9,53	1,053	Aceitável
	Fruits secs	2,482	46,62	1,920	Aceitável	47,99	1,329	Aceitável
	Côco	2,482	67,20	2,236	Aceitável	68,85	0,880	Aceitável
Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados	Azeite	1,764	92,33	1,129	Aceitável	96,96	0,837	Aceitável
	Maionese	2,482	60,92	1,944	Aceitável	65,31	1,121	Aceitável
	Sementes de chia	1,764	35,66	1,715	Aceitável	37,61	0,690	Aceitável
Leite, produtos lácteos e derivados	Gelado em cones	2,482	10,73	1,399	Aceitável	10,97	1,305	Aceitável
	Sobremesa láctea	2,482	11,10	2,051	Aceitável	15,84	1,299	Aceitável
Produtos de pesca e derivados	Conserva em água	1,764	0,7054	1,177	Aceitável	0,8055	1,055	Aceitável
	Conserva em óleo	2,482	13,83	2,371	Aceitável	15,25	1,021	Aceitável
	Salmão	2,482	14,23	1,540	Aceitável	14,92	1,549	Aceitável

Anexo VII – Estudo da precisão intermédia

Estudo da precisão intermédia de todas as amostras

Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	$(E_1 - E_2)$	$(E_1 - E_2)^2$	Média
Alimento para gato	11,72	11,93	0,21	0,043	11,82
Alimento para gato	11,33	11,38	0,055	0,0030	11,35
Alimento para gato	11,96	11,32	0,64	0,40	11,64
Alimento para gato	12,34	12,74	0,40	0,16	12,54
Alimento para gato	12,85	12,58	0,27	0,073	12,72

População: 5

Desvio padrão da precisão intermédia (S_i): 0,26

Limite da precisão intermédia 6,1%

Inter 2000 Cárnico	33,34	33,41	0,070	0,0049	33,38
Inter 2000 Cárnico	33,00	33,12	0,12	0,014	33,06
Inter 2000 Cárnico	33,12	33,12	0,01	0,00	33,12
Inter 2000 Cárnico	36,04	35,92	0,12	0,014	35,98
Inter 2000 Cárnico	34,52	35,19	0,66	0,44	34,85

População: 5

Desvio padrão da precisão intermédia (S_i): 0,22

Limite da precisão intermédia 1,8%

Farinha de carne	11,09	11,10	0,010	0,00	11,10
Farinha de carne	11,95	12,07	0,12	0,014	12,01
Farinha de carne	12,12	12,67	0,55	0,30	12,40
Farinha de carne	13,90	13,29	0,61	0,37	13,60
Farinha de carne	13,08	13,76	0,68	0,46	13,42

População: 5

Desvio padrão da precisão intermédia (S_i): 0,34

Limite da precisão intermédia 7,6%

Meat LGC 730	24,29	24,54	0,25	0,063	24,42
Meat LGC 730	24,56	24,31	0,25	0,063	24,44
Meat LGC 730	24,61	24,61	0,00	0,00	24,61
Meat LGC 730	25,39	25,33	0,060	0,0036	25,36
Meat LGC 730	23,08	23,15	0,070	0,0049	23,12

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,12
Limite da precisão intermédia	1,3%

Meat LGC 731	19,68	19,52	0,16	0,026	19,60
Meat LGC 731	19,29	19,32	0,03	0,00	19,31
Meat LGC 731	20,69	21,00	0,31	0,096	20,84
Meat LGC 731	19,82	19,72	0,10	0,010	19,77
Meat LGC 731	21,06	21,89	0,83	0,69	21,48

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,29
Limite da precisão intermédia	4,0%

Alimento bebé	2,503	2,535	0,03	0,00	2,52
Alimento bebé	2,591	2,557	0,03	0,00	2,57
Alimento bebé	2,757	2,594	0,16	0,03	2,68
Alimento bebé	2,622	2,248	0,37	0,14	2,44
Alimento bebé	2,365	2,481	0,12	0,01	2,42

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,14
Limite da precisão intermédia	15%

Mostarda	0,7977	0,7328	0,06	0,00	0,77
Mostarda	0,9568	0,9800	0,02	0,00	0,97
Mostarda	0,9024	0,8449	0,06	0,00	0,87
Mostarda	1,129	1,123	0,01	0,00	1,13
Mostarda	0,9437	0,9833	0,04	0,00	0,96

População: 5					
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i): 0,03					
Limite da precisão intermédia 3,3%					
Farinha láctea	1,875	1,982	0,11	0,01	1,93
Farinha láctea	1,675	1,968	0,29	0,09	1,82
Farinha láctea	2,14	2,21	0,07	0,00	2,17
Farinha láctea	1,78	1,82	0,04	0,00	1,80
Farinha láctea	2,29	2,03	0,26	0,07	2,16
População: 5					
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i): 0,13					
Limite da precisão intermédia 19%					
Batata frita	29,07	29,05	0,02	0,00	29,06
Batata frita	28,46	28,09	0,37	0,13	28,28
Batata frita	27,69	27,72	0,03	0,00	27,71
Batata frita	25,27	25,55	0,28	0,08	25,41
Batata frita	28,74	28,85	0,11	0,01	28,79
População: 5					
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i): 0,15					
Limite da precisão intermédia 1,5%					
Bebida de soja	2,543	2,543	0,00	0,00	2,54
Bebida de soja	2,403	2,636	0,23	0,05	2,52
Bebida de soja	2,478	2,570	0,09	0,01	2,52
Bebida de soja	2,465	2,859	0,39	0,16	2,66
Bebida de soja	2,874	2,811	0,06	0,00	2,84
População: 5					
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i): 0,15					
Limite da precisão intermédia 16%					

Cordon Bleu	12,25	12,43	0,18	0,03	12,34
Cordon Bleu	12,28	12,01	0,27	0,07	12,14
Cordon Bleu	12,69	12,48	0,21	0,04	12,59
Cordon Bleu	12,61	12,53	0,08	0,01	12,57
Cordon Bleu	12,29	12,87	0,58	0,33	12,58

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,22
Limite da precisão intermédia	5,0%

Bolacha Belga	16,05	16,65	0,60	0,36	16,35
Bolacha Belga	15,83	15,79	0,04	0,00	15,81
Bolacha Belga	15,86	15,85	0,01	0,00	15,85
Bolacha Belga	15,36	15,26	0,11	0,01	15,31
Bolacha Belga	16,19	16,17	0,02	0,00	16,18

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,13
Limite da precisão intermédia	3,4%

Bolacha Torrada	8,828	8,941	0,11	0,01	8,88
Bolacha Torrada	9,379	9,307	0,07	0,01	9,34
Bolacha Torrada	9,438	9,380	0,06	0,00	9,41
Bolacha Torrada	8,971	8,906	0,06	0,00	8,94
Bolacha Torrada	8,842	8,665	0,18	0,03	8,75

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,075
Limite da precisão intermédia	2,3%

Café moído	14,773	14,508	0,26	0,07	14,64
Café moído	15,24	14,82	0,42	0,17	15,03
Café moído	13,80	13,22	0,58	0,34	13,51
Café moído	12,97	12,96	0,01	0,00	12,97
Café moído	14,82	14,42	0,40	0,16	14,62

População:		5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):		0,27
Limite da precisão intermédia		5,4%

Cappucino	15,45	15,61	0,17	0,03	15,53
Cappucino	16,35	16,39	0,04	0,00	16,37
Cappucino	16,21	16,11	0,10	0,01	16,16
Cappucino	16,67	16,79	0,13	0,02	16,73
Cappucino	16,96	16,96	0,00	0,00	16,96

População:		5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):		0,075
Limite da precisão intermédia		1,3%

Chouriço	33,34	33,41	0,07	0,01	33,38
Chouriço	33,00	33,12	0,11	0,01	33,06
Chouriço	33,12	33,12	0,01	0,00	33,12
Chouriço	36,04	35,92	0,12	0,02	35,98
Chouriço	34,52	35,19	0,66	0,44	34,85

População:		5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):		0,22
Limite da precisão intermédia		1,8%

Chocolate em pó	10,45	10,40	0,05	0,00	10,42
Chocolate em pó	10,21	10,70	0,50	0,25	10,45
Chocolate em pó	10,77	10,81	0,04	0,00	10,79
Chocolate em pó	10,60	10,55	0,05	0,00	10,58
Chocolate em pó	10,24	10,43	0,19	0,04	10,34

População:		5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):		0,17
Limite da precisão intermédia		4,5%

Conserva em azeite	14,07	14,51	0,44	0,19	14,29
Conserva em azeite	13,98	13,96	0,02	0,00	13,97
Conserva em azeite	14,65	14,57	0,08	0,01	14,61
Conserva em azeite	14,45	14,38	0,07	0,00	14,41
Conserva em azeite	14,84	14,96	0,11	0,01	14,90

População: 5

Desvio padrão da precisão intermédia (S_i): 0,15

Limite da precisão intermédia 2,8%

Fiambre	2,726	2,843	0,12	0,01	2,78
Fiambre	2,674	2,447	0,23	0,05	2,56
Fiambre	2,536	2,632	0,10	0,01	2,58
Fiambre	2,512	2,765	0,25	0,06	2,64
Fiambre	2,207	2,177	0,03	0,00	2,19

População: 5

Desvio padrão da precisão intermédia (S_i): 0,12

Limite da precisão intermédia 13%

Frutos secos	46,15	46,97	0,82	0,68	46,56
Frutos secos	47,23	47,49	0,26	0,07	47,36
Frutos secos	46,36	46,86	0,50	0,25	46,61
Frutos secos	43,77	43,33	0,44	0,19	43,55
Frutos secos	46,52	46,74	0,22	0,05	46,63

População: 5

Desvio padrão da precisão intermédia (S_i): 0,35

Limite da precisão intermédia 2,1%

Gelado em cone	10,75	10,99	0,24	0,06	10,87
Gelado em cone	10,12	10,46	0,34	0,12	10,29
Gelado em cone	10,53	10,48	0,05	0,00	10,51
Gelado em cone	10,22	10,46	0,25	0,06	10,34
Gelado em cone	10,86	10,76	0,11	0,01	10,81

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,16
Limite da precisão intermédia	4,2%

Linhaça	39,70	39,52	0,18	0,03	39,61
Linhaça	39,11	40,48	1,38	1,89	39,80
Linhaça	45,24	44,34	0,90	0,81	44,79
Linhaça	41,09	42,20	1,10	1,22	41,64
Linhaça	38,73	38,56	0,17	0,03	38,64

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,63
Limite da precisão intermédia	4,3%

Maionese	69,36	68,92	0,44	0,19	69,14
Maionese	65,43	64,06	1,38	1,89	64,74
Maionese	65,43	65,14	0,29	0,08	65,29
Maionese	66,03	66,65	0,62	0,38	66,34
Maionese	67,51	66,56	0,95	0,91	67,03

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,53
Limite da precisão intermédia	2,5%

Mostarda	0,7977	0,7328	0,06	0,00	0,77
Mostarda	0,9568	0,9800	0,02	0,00	0,97
Mostarda	0,9437	0,9833	0,04	0,00	0,96
Mostarda	1,1291	1,1226	0,01	0,00	1,13
Mostarda	1,2020	1,0823	0,12	0,01	1,14

População:		5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):		0,045
Limite da precisão intermédia		13%

Pão de forma	2,112	2,109	0,00	0,00	2,11
Pão de forma	2,100	2,248	0,15	0,02	2,17
Pão de forma	2,048	2,157	0,11	0,01	2,10
Pão de forma	2,004	2,178	0,17	0,03	2,09
Pão de forma	2,251	2,217	0,03	0,00	2,23

População:		5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):		0,081
Limite da precisão intermédia		11%

Salmão	14,34	14,26	0,08	0,01	14,30
Salmão	14,68	14,52	0,16	0,03	14,60
Salmão	14,02	14,66	0,64	0,40	14,34
Salmão	12,43	12,38	0,05	0,00	12,41
Salmão	14,49	14,06	0,43	0,19	14,27

População:		5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):		0,25
Limite da precisão intermédia		5,0%

Cereal Peq. Alm.	10,62	10,68	0,05	0,00	10,65
Cereal Peq. Alm.	10,34	10,21	0,13	0,02	10,28
Cereal Peq. Alm.	10,16	10,23	0,07	0,00	10,19
Cereal Peq. Alm.	10,02	10,53	0,50	0,25	10,27
Cereal Peq. Alm.	10,43	10,54	0,10	0,01	10,49

População:		5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):		0,17
Limite da precisão intermédia		4,6%

Chocolate barrar	34,36	34,23	0,13	0,02	34,30
Chocolate barrar	34,37	34,15	0,22	0,05	34,26
Chocolate barrar	34,84	34,68	0,16	0,03	34,76
Chocolate barrar	32,91	32,99	0,07	0,01	32,95
Chocolate barrar	33,15	33,08	0,07	0,00	33,12

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,10
Limite da precisão intermédia	0,80%

Torresmo	11,27	11,90	0,64	0,41	11,59
Torresmo	12,32	12,06	0,26	0,07	12,19
Torresmo	12,50	12,81	0,31	0,09	12,65
Torresmo	11,98	11,37	0,61	0,37	11,67
Torresmo	11,81	11,65	0,17	0,03	11,73

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,31
Limite da precisão intermédia	7,3%

Alga	9,534	9,471	0,06	0,00	9,50
Alga	9,956	9,350	0,61	0,37	9,65
Alga	10,201	10,339	0,14	0,02	10,27
Alga	8,601	8,542	0,06	0,00	8,57
Alga	8,573	8,394	0,18	0,03	8,48

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,20
Limite da precisão intermédia	6,0%

Azeite	96,56	96,96	0,41	0,17	96,76
Azeite	98,65	98,17	0,48	0,23	98,41
Azeite	97,51	97,20	0,31	0,10	97,36
Azeite	99,24	99,04	0,20	0,04	99,14
Azeite	98,47	98,82	0,36	0,13	98,65

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,26
Limite da precisão intermédia	0,73%

Caldo galinha	19,58	19,08	0,49	0,24	19,33
Caldo galinha	18,63	18,81	0,18	0,03	18,72
Caldo galinha	19,76	19,32	0,44	0,19	19,54
Caldo galinha	19,50	19,88	0,38	0,14	19,69
Caldo galinha	19,94	19,38	0,56	0,32	19,66

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,31
Limite da precisão intermédia	4,4%

Chocolate pedaços	36,92	36,82	0,10	0,01	36,87
Chocolate pedaços	36,99	37,18	0,18	0,03	37,09
Chocolate pedaços	37,66	37,52	0,13	0,02	37,59
Chocolate pedaços	37,50	37,11	0,39	0,15	37,31
Chocolate pedaços	37,12	37,67	0,55	0,30	37,39

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,23
Limite da precisão intermédia	1,7%

Coco ralado	62,87	64,19	1,32	1,75	63,53
Coco ralado	68,13	68,59	0,46	0,21	68,36
Coco ralado	68,22	68,03	0,19	0,04	68,13
Coco ralado	68,07	68,59	0,52	0,27	68,33
Coco ralado	68,26	68,60	0,34	0,12	68,43

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,49
Limite da precisão intermédia	2,0%

Conserva em água	0,7226	0,8001	0,08	0,01	0,76
Conserva em água	0,5424	0,5102	0,03	0,00	0,53
Conserva em água	0,6400	0,6430	0,00	0,00	0,64
Conserva em água	0,7693	0,8124	0,04	0,00	0,79
Conserva em água	0,6708	0,6480	0,02	0,00	0,66

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,031
Limite da precisão intermédia	13%

Natas do céu	13,70	13,46	0,23	0,05	13,58
Natas do céu	13,82	13,64	0,18	0,03	13,73
Natas do céu	13,75	13,46	0,29	0,08	13,60
Natas do céu	14,42	14,38	0,04	0,00	14,40
Natas do céu	14,36	14,50	0,15	0,02	14,43

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,14
Limite da precisão intermédia	2,8%

Pastelaria	20,98	20,04	0,94	0,88	20,51
Pastelaria	20,36	20,64	0,28	0,08	20,50
Pastelaria	19,91	19,84	0,07	0,00	19,88
Pastelaria	19,80	19,97	0,16	0,03	19,89
Pastelaria	20,56	20,77	0,21	0,05	20,67

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,32
Limite da precisão intermédia	4,5%

Semente chia	25,21	25,41	0,19	0,04	25,31
Semente chia	31,09	31,19	0,10	0,01	31,14
Semente chia	27,56	27,45	0,11	0,01	27,50
Semente chia	32,81	32,65	0,17	0,03	32,73
Semente chia	30,54	30,13	0,40	0,16	30,34

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,16
Limite da precisão intermédia	1,5%

Suplemento Alim.	4,40	4,22	0,18	0,03	4,31
Suplemento Alim.	3,75	3,71	0,04	0,00	3,73
Suplemento Alim.	4,31	4,54	0,23	0,05	4,43
Suplemento Alim.	3,22	3,27	0,05	0,00	3,25
Suplemento Alim.	4,31	4,76	0,44	0,20	4,53

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,17
Limite da precisão intermédia	12%

Tiras de milho	32,18	32,25	0,07	0,00	32,22
Tiras de milho	35,37	35,34	0,03	0,00	35,36
Tiras de milho	33,24	33,39	0,15	0,02	33,31
Tiras de milho	35,44	35,39	0,05	0,00	35,41
Tiras de milho	33,07	33,22	0,15	0,02	33,15

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,073
Limite da precisão intermédia	0,60%

Tosta	12,28	12,08	0,20	0,04	12,18
Tosta	10,47	10,40	0,07	0,01	10,43
Tosta	10,07	10,17	0,10	0,01	10,12
Tosta	9,936	9,927	0,01	0,00	9,93
Tosta	9,871	9,883	0,01	0,00	9,88

População:	5
Desvio padrão da precisão intermédia (S_i):	0,086
Limite da precisão intermédia	2,4%

Anexo VIII – Estudo da precisão intermédia relativa

Classe Matéria Gorda ≤ 10 g/100 g

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	$(E_1 - E_2)$	$(E_1 - E_2)^2$	Média
Alimento bebé	2,503	2,535	0,03	0,00	2,52
Alimento bebé	2,591	2,557	0,03	0,00	2,57
Alimento bebé	2,757	2,594	0,16	0,03	2,68
Alimento bebé	2,622	2,248	0,37	0,14	2,44
Alimento bebé	2,365	2,481	0,12	0,01	2,42
Mostarda	0,7977	0,7328	0,06	0,00	0,77
Mostarda	0,9568	0,9800	0,02	0,00	0,97
Mostarda	0,9024	0,8449	0,06	0,00	0,87
Mostarda	1,129	1,123	0,01	0,00	1,13
Mostarda	0,9437	0,9833	0,04	0,00	0,96
Farinha láctea	1,875	1,982	0,11	0,01	1,93
Farinha láctea	1,675	1,968	0,29	0,09	1,82
Farinha láctea	2,14	2,21	0,07	0,00	2,17
Farinha láctea	1,78	1,82	0,04	0,00	1,80
Farinha láctea	2,29	2,03	0,26	0,07	2,16
Bebida de soja	2,543	2,543	0,00	0,00	2,54
Bebida de soja	2,403	2,636	0,23	0,05	2,52
Bebida de soja	2,478	2,570	0,09	0,01	2,52
Bebida de soja	2,465	2,859	0,39	0,16	2,66
Bebida de soja	2,874	2,811	0,06	0,00	2,84
Bebida de soja	2,824	2,866	0,04	0,00	2,84
Bolacha Torrada	8,828	8,941	0,11	0,01	8,88
Bolacha Torrada	9,379	9,307	0,07	0,01	9,34
Bolacha Torrada	9,438	9,380	0,06	0,00	9,41
Bolacha Torrada	8,971	8,906	0,06	0,00	8,94
Bolacha Torrada	8,842	8,665	0,18	0,03	8,75
Fiambre	2,726	2,843	0,12	0,01	2,78
Fiambre	2,674	2,447	0,23	0,05	2,56

Fiambre	2,536	2,632	0,10	0,01	2,58
Fiambre	2,512	2,765	0,25	0,06	2,64
Fiambre	2,207	2,177	0,03	0,00	2,19
Mostarda	0,7977	0,7328	0,06	0,00	0,77
Mostarda	0,9568	0,9800	0,02	0,00	0,97
Mostarda	0,9437	0,9833	0,04	0,00	0,96
Mostarda	1,1291	1,1226	0,01	0,00	1,13
Mostarda	1,2020	1,0823	0,12	0,01	1,14
Pão de forma	2,112	2,109	0,00	0,00	2,11
Pão de forma	2,100	2,248	0,15	0,02	2,17
Pão de forma	2,048	2,157	0,11	0,01	2,10
Pão de forma	2,004	2,178	0,17	0,03	2,09
Pão de forma	2,251	2,217	0,03	0,00	2,23
Alga	9,534	9,471	0,06	0,00	9,50
Alga	9,956	9,350	0,61	0,37	9,65
Alga	10,201	10,339	0,14	0,02	10,27
Alga	8,601	8,542	0,06	0,00	8,57
Alga	8,573	8,394	0,18	0,03	8,48
Conserva em água	0,7226	0,8001	0,08	0,01	0,76
Conserva em água	0,5424	0,5102	0,03	0,00	0,53
Conserva em água	0,6400	0,6430	0,00	0,00	0,64
Conserva em água	0,7693	0,8124	0,04	0,00	0,79
Conserva em água	0,6708	0,6480	0,02	0,00	0,66
Suplemento Alim.	4,40	4,22	0,18	0,03	4,31
Suplemento Alim.	3,75	3,71	0,04	0,00	3,73
Suplemento Alim.	4,31	4,54	0,23	0,05	4,43
Suplemento Alim.	3,22	3,27	0,05	0,00	3,25
Suplemento Alim.	4,31	4,76	0,44	0,20	4,53
População:					56
Desvio Padrão precisão intermédia:					0,119
Limite de precisão intermédia:					9,993
Valor minorado:					9

Classe $10 \text{ g} \leq \text{Matéria Gorda} \leq 20 \text{ g}/100 \text{ g}$

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	$(E_1 - E_2)$	$(E_1 - E_2)^2$	Média
Alimento para gato	11,72	11,93	0,21	0,04	11,82
Alimento para gato	11,33	11,38	0,05	0,00	11,35
Alimento para gato	11,96	11,32	0,64	0,40	11,64
Alimento para gato	12,34	12,74	0,40	0,16	12,54
Alimento para gato	12,85	12,58	0,27	0,07	12,72
Farinha de carne	11,09	11,10	0,02	0,00	11,10
Farinha de carne	11,95	12,07	0,12	0,01	12,01
Farinha de carne	12,12	12,67	0,55	0,30	12,40
Farinha de carne	13,90	13,29	0,60	0,36	13,60
Farinha de carne	13,08	13,76	0,68	0,46	13,42
Meat LGC 731	19,68	19,52	0,15	0,02	19,60
Meat LGC 731	19,29	19,32	0,03	0,00	19,31
Meat LGC 731	20,69	21,00	0,31	0,10	20,84
Meat LGC 731	19,82	19,72	0,10	0,01	19,77
Meat LGC 731	21,06	21,89	0,83	0,69	21,48
Cordon Bleu	12,25	12,43	0,18	0,03	12,34
Cordon Bleu	12,28	12,01	0,27	0,07	12,14
Cordon Bleu	12,69	12,48	0,21	0,04	12,59
Cordon Bleu	12,61	12,53	0,08	0,01	12,57
Cordon Bleu	12,29	12,87	0,58	0,33	12,58
Bolacha Belga	16,05	16,65	0,60	0,36	16,35
Bolacha Belga	15,83	15,79	0,04	0,00	15,81
Bolacha Belga	15,86	15,85	0,01	0,00	15,85
Bolacha Belga	15,36	15,26	0,11	0,01	15,31
Bolacha Belga	16,19	16,17	0,02	0,00	16,18
Tosta	12,28	12,08	0,20	0,04	12,18
Tosta	10,47	10,40	0,07	0,01	10,43
Tosta	10,07	10,17	0,10	0,01	10,12
Tosta	9,936	9,927	0,01	0,00	9,93

Tosta	9,871	9,883	0,01	0,00	9,88
Café moído	14,77	14,508	0,26	0,07	14,64
Café moído	15,24	14,82	0,42	0,17	15,03
Café moído	13,80	13,22	0,58	0,34	13,51
Café moído	12,97	12,96	0,01	0,00	12,97
Café moído	14,82	14,42	0,40	0,16	14,62
Cappucino	15,45	15,61	0,17	0,03	15,53
Cappucino	16,35	16,39	0,04	0,00	16,37
Cappucino	16,21	16,11	0,10	0,01	16,16
Cappucino	16,67	16,79	0,13	0,02	16,73
Cappucino	16,96	16,96	0,00	0,00	16,96
Gelado em cone	10,75	10,99	0,24	0,06	10,87
Gelado em cone	10,12	10,46	0,34	0,12	10,29
Gelado em cone	10,53	10,48	0,05	0,00	10,51
Gelado em cone	10,22	10,46	0,25	0,06	10,34
Gelado em cone	10,86	10,76	0,11	0,01	10,81
Chocolate em pó	10,45	10,40	0,05	0,00	10,42
Chocolate em pó	10,21	10,70	0,50	0,25	10,45
Chocolate em pó	10,77	10,81	0,04	0,00	10,79
Chocolate em pó	10,60	10,55	0,05	0,00	10,58
Chocolate em pó	10,24	10,43	0,19	0,04	10,34
Conserva em azeite	14,07	14,51	0,44	0,19	14,29
Conserva em azeite	13,98	13,96	0,02	0,00	13,97
Conserva em azeite	14,65	14,57	0,08	0,01	14,61
Conserva em azeite	14,45	14,38	0,07	0,00	14,41
Conserva em azeite	14,84	14,96	0,11	0,01	14,90
Natas do céu	13,70	13,46	0,23	0,05	13,58
Natas do céu	13,82	13,64	0,18	0,03	13,73
Natas do céu	13,75	13,46	0,29	0,08	13,60
Natas do céu	14,42	14,38	0,04	0,00	14,40
Natas do céu	14,36	14,50	0,15	0,02	14,43
Salmão	14,34	14,26	0,08	0,01	14,30

Salmão	14,68	14,52	0,16	0,03	14,60
Salmão	14,02	14,66	0,64	0,40	14,34
Salmão	12,43	12,38	0,05	0,00	12,41
Salmão	14,49	14,06	0,43	0,19	14,27
Cereal Peq. Alm.	10,62	10,68	0,05	0,00	10,65
Cereal Peq. Alm.	10,34	10,21	0,13	0,02	10,28
Cereal Peq. Alm.	10,16	10,23	0,07	0,00	10,19
Cereal Peq. Alm.	10,02	10,53	0,50	0,25	10,27
Cereal Peq. Alm.	10,43	10,54	0,10	0,01	10,49
Torresmo	11,27	11,90	0,64	0,41	11,59
Torresmo	12,32	12,06	0,26	0,07	12,19
Torresmo	12,50	12,81	0,31	0,09	12,65
Torresmo	11,98	11,37	0,61	0,37	11,67
Torresmo	11,81	11,65	0,17	0,03	11,73
Caldo galinha	19,58	19,08	0,49	0,24	19,33
Caldo galinha	18,63	18,81	0,18	0,03	18,72
Caldo galinha	19,76	19,32	0,44	0,19	19,54
Caldo galinha	19,50	19,88	0,38	0,14	19,69
Caldo galinha	19,94	19,38	0,56	0,32	19,66
População:					80
Desvio Padrão precisão intermédia:					0,225
Limite de precisão intermédia:					4,604
Valor minorado:					4

Classe 20 g ≤ Matéria Gorda ≤ 40 g/100 g

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	(E ₁ -E ₂)	(E ₁ -E ₂) ²
Batata frita	29,07	29,05	0,02	0,00
Batata frita	28,46	28,09	0,37	0,13
Batata frita	27,69	27,72	0,03	0,00
Batata frita	25,27	25,55	0,28	0,08
Batata frita	28,74	28,85	0,11	0,01
Inter 2000 Cárnico	33,34	33,41	0,07	0,01
Inter 2000 Cárnico	33,00	33,12	0,11	0,01
Inter 2000 Cárnico	33,12	33,12	0,01	0,00
Inter 2000 Cárnico	36,04	35,92	0,12	0,02
Inter 2000 Cárnico	34,52	35,19	0,66	0,44
Tiras de milho	32,18	32,25	0,07	0,00
Tiras de milho	35,37	35,34	0,03	0,00
Tiras de milho	33,24	33,39	0,15	0,02
Tiras de milho	35,44	35,39	0,05	0,00
Tiras de milho	33,07	33,22	0,15	0,02
Meat LGC 730	24,29	24,54	0,25	0,06
Meat LGC 730	24,56	24,31	0,26	0,07
Meat LGC 730	24,61	24,61	0,00	0,00
Meat LGC 730	25,39	25,33	0,06	0,00
Meat LGC 730	23,08	23,15	0,07	0,01
Pastelaria	20,98	20,04	0,94	0,88
Pastelaria	20,36	20,64	0,28	0,08
Pastelaria	19,91	19,84	0,07	0,00
Pastelaria	19,80	19,97	0,16	0,03
Pastelaria	20,56	20,77	0,21	0,05
Sementes chia	25,21	25,41	0,19	0,04
Sementes chia	31,09	31,19	0,10	0,01
Sementes chia	27,56	27,45	0,11	0,01
Sementes chia	32,81	32,65	0,17	0,03

Sementes chia	30,54	30,13	0,40	0,16
Chocolate barrar	34,36	34,23	0,13	0,02
Chocolate barrar	34,37	34,15	0,22	0,05
Chocolate barrar	34,84	34,68	0,16	0,03
Chocolate barrar	32,91	32,99	0,07	0,01
Chocolate barrar	33,15	33,08	0,07	0,00
Chocolate pedaços	36,92	36,82	0,10	0,01
Chocolate pedaços	36,99	37,18	0,18	0,03
Chocolate pedaços	37,66	37,52	0,13	0,02
Chocolate pedaços	37,50	37,11	0,39	0,15
Chocolate pedaços	37,12	37,67	0,55	0,30

População:	40
Desvio Padrão precisão intermédia:	0,187
Limite de precisão intermédia:	1,737
Valor minorado:	1

Classe Matéria Gorda ≥ 40 g/100 g

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	(E_1-E_2)	$(E_1-E_2)^2$
Coc ralado	62,87	64,19	1,32	1,75
Coc ralado	68,13	68,59	0,46	0,21
Coc ralado	68,22	68,03	0,19	0,04
Coc ralado	68,07	68,59	0,52	0,27
Coc ralado	68,26	68,60	0,34	0,12
Azeite	96,56	96,96	0,41	0,17
Azeite	98,65	98,17	0,48	0,23
Azeite	97,51	97,20	0,31	0,10
Azeite	99,24	99,04	0,20	0,04
Azeite	98,47	98,82	0,36	0,13
Linhaça	39,70	39,52	0,18	0,03
Linhaça	39,11	40,48	1,38	1,89
Linhaça	45,24	44,34	0,90	0,81
Linhaça	41,09	42,20	1,10	1,22
Linhaça	38,73	38,56	0,17	0,03
Maionese	69,36	68,92	0,44	0,19
Maionese	65,43	64,06	1,38	1,89
Maionese	65,43	65,14	0,29	0,08
Maionese	66,03	66,65	0,62	0,38
Maionese	67,51	66,56	0,95	0,91
Frutos secos	46,15	46,97	0,82	0,68
Frutos secos	47,23	47,49	0,26	0,07
Frutos secos	46,36	46,86	0,50	0,25
Frutos secos	43,77	43,33	0,44	0,19
Frutos secos	46,52	46,74	0,22	0,05

População: 25

Desvio Padrão precisão intermédia: 0,484

Limite de precisão intermédia: 0,02126

Valor minorado: 0

